

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Jan Šimek

**Diferenciace kvasinkových populací *Saccharomyces cerevisiae*:
studium vlivu kultivačních podmínek**

Differentiation within yeast populations of *Saccharomyces cerevisiae*:
influence of cultivation conditions

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13.8.2015

Podpis:_____

Rád bych zde poděkoval vedoucí své diplomové práce paní prof. RNDr. Zdeně Palkové, CSc. za uvedení do výzkumné práce a inspiraci ve vědeckém bádání. Dále bych rád poděkoval RNDr. Michalu Čápovi, Ph.D. za každodenní podporu v laboratorní práci a za cenné připomínky a konzultace. Děkuji také PhDr. et. Mgr. Barboře Pánkové za podporu a rady. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině, a to zejména rodičům Marcele a Dušanovi, za podporu během celé doby studia.

Abstrakt

Dlouhodobý výzkum chronologicky stárnoucích populací laboratorních kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* odhalil, že kvasinky jsou schopny diferenciovat a vytvářet specializované buněčné typy. V současné době je nejpodrobněji popsána diferenciací tekutých kultur rostoucích v médiu bohatém na glukózu a kolonií rostoucích na pevném glycerolovém médiu, v nichž kvasinky vytvářejí dvě morfologicky odlišné skupiny buněk, jež přizpůsobují svůj metabolismus a fyziologii ve prospěch dlouhodobého přežití populace. V rámci diplomové práce byly z kolonií rostoucích na pevném glukózovém médiu a z tekutých kultur kultivovaných v glycerolovém médiu izolovány buněčné subpopulace lišící se v některých parametrech od subpopulací dříve popsaných.

Nově izolované subpopulace byly porovnány s již známými buněčnými typy kolonií a tekutých kultur. Analyzována byla jejich stresová odolnost a vybrané metabolické procesy. Na základě předchozích výzkumů diferenciací kvasinkových populací byly vytipovány proteiny, jejichž exprese byla u jednotlivých populací buněk sledována pomocí fúze s fluorescenčním proteinem GFP. Výsledky ukázaly, že složení média a forma kultivace ovlivňují vývoj a metabolismus jednotlivých diferenciovaných buněčných subpopulací.

Klíčová slova: *Saccharomyces cerevisiae*, BY4742, buněčná diferenciací, kvasinkové populace, Q buňky, NQ buňky, Gly-Q buňky, U buňky, L buňky, YPD-U buňky, YPD-L buňky

Abstract

Long-time research of chronologically aging yeast populations of *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strains revealed that yeasts are able to differentiate into specialized cell types. Differentiation of liquid cultures growing in glucose rich medium and differentiation of colonies growing on solid glycerol medium has been previously studied. These populations create two fractions of cells with diverse morphology which adapt their metabolism and physiology to enable a long-term survival of the yeast population in environment with limited nutritional potential. In this study, yeast subpopulations isolated from colonies growing on solid glucose medium and liquid cultures cultivated in glycerol medium were characterized.

Newly isolated cell types were compared with already known cell types isolated from colonies and liquid cultures. Selected metabolic processes and stress resistance were analysed in studied populations. Based on previous studies of yeast differentiation, a spectrum of GFP-labelled marker proteins was chosen and production and localization of these marker proteins was monitored within yeast populations. Results of the analyses showed that type of medium and cultivation influence development and metabolism of each yeast cell type.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, BY4742, cell differentiation, yeast populations, Q cells, NQ cells, Gly-Q cells, U cells, L cells, YPD-U cells, YPD-L cells

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Literální přehled	10
2.1	Klidové stádium buněk.....	10
2.2	Klidové stádium u kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
2.2.1	Stacionární fáze kultivace.....	12
2.2.2	Přechod do klidové formy	13
2.2.3	Výstup z klidového stádia.....	14
2.2.4	Adaptace metabolismu na nepříznivé podmínky.....	14
2.2.5	Signalizační kaskády	16
2.3	Diferenciace kvasinkových populací	19
2.3.1	Buněčné typy izolované z populace rostoucí v tekutém na glukózu bohatém médiu	19
2.3.2	Buněčné typy izolované z populace kvasinek produkujících bioethanol v alkoholovém fermentoru.....	25
2.3.3	Diferenciace kolonií <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
2.3.4	Reportérové proteiny fúzované s GFP	30
3	Materiál a metody	33
3.1	Materiál	33
3.1.1	Použité mikroorganismy	33
3.1.2	Použité plazmidy	33
3.1.3	Použité primery	34
3.1.4	Kultivační média	35
3.1.5	Internetové databáze a počítačové programy	37
3.1.6	Materiál pro práci s DNA	38
3.2	Metodika.....	38
3.2.1	Sterilizace	38
3.2.2	Skladování kvasinkových kmenů	38
3.2.3	Kultivace kvasinkových kmenů	38
3.2.4	Konstrukce kmenů odvozených od BY4742.....	39
3.2.5	Měření optické denzity buněčných kultur.....	43
3.2.6	Sledování mikroskopických preparátů.....	44
3.2.7	Výroba ultratenkých řezů kolonií.....	44
3.2.8	Barvení buněčných jader.....	44
3.2.9	Dělení buněk na sacharózovém gradientu	44
3.2.10	Měření účinku zymolýzy.....	45

3.2.11	Měření intenzity emisního záření	46
3.2.12	Měření respirace.....	46
3.2.13	Analýza teplotní odolnosti	46
3.2.14	Analýza enzymatické aktivity	47
4	Cíle práce.....	50
5	Výsledky	51
5.1	Charakteristika buněčných populací izolovaných z odlišných kultivačních médií	51
5.2	Charakterizace obřích kolonií kmene BY4742 rostoucích na pevném glukózovém médiu	52
5.3	Konstrukce kmenů s vybranými proteiny fúzovanými s EGFP	54
5.4	Expres a lokalizace fúzních GFP proteinů v závislosti na podmínkách kultivace ...	58
5.4.1	BY4742: <i>ATO3-EGFP</i>	59
5.4.2	BY4742: <i>INO1-EGFP</i>	61
5.4.3	BY4742: <i>MET17-EGFP</i>	63
5.4.4	BY4742: <i>OLE1-EGFP</i>	65
5.4.5	BY4742: <i>POX1-EGFP</i>	67
5.4.6	BY4742: <i>CIT1-EGFP</i>	69
5.4.7	BY4742: <i>NCE102-EGFP</i>	71
5.4.8	BY4742: <i>FBP1-EGFP</i>	73
5.4.9	BY4742: <i>RPL22A-EGFP</i>	75
5.4.10	BY4742: <i>ACS1-EGFP</i>	77
5.5	Stresová odolnost izolovaných buněčných populací	80
5.5.1	Odolnost vůči teplotnímu šoku	80
5.5.2	Citlivost k účinkům zymolyázy	80
5.6	Porovnání vybraných metabolických procesů jednotlivých buněčných populací	81
5.6.1	Enzymatická aktivita	81
5.6.2	Respirace	83
5.7	Souhrnná tabulka výsledků	85
6	Diskuze.....	86
6.1	Metody izolace diferenciovaných kvasinkových buněk.....	86
6.2	Diferenciace kvasinkových populací laboratorních kmenů kvasinek	87
6.3	Porovnání buněčných typů	88
6.3.1	Stresová odolnost	88
6.3.2	Metabolická aktivita	89
6.3.3	Expres GFP proteinů	90
7	Souhrn.....	93

8	Seznam použité literatury	94
9	Přílohy.....	107
9.1	Dělení kultur kultivovaných v tekutém glukózovém médiu.....	107
9.2	Kultury kultivované v tekutém glycerolovém médiu.....	108
9.3	Sekvenční analýza zkonstruovaných kmenů	110

Seznam zkratek

ADH	alkoholdehydrogenáza
ATP	adenosintrifosfát
bp	páry bazí
BY4742	laboratorní kmen kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cdc	cyklus buněčného dělení
DHE	dihydroethidium
DTT	dithiotreitol
EGFP	modifikovaný zelený fluorescenční protein se zesílenou fluorescencí
EtOH	ethanol
FWD	přímý (primer)
GFP	zelený fluorescenční protein
Gly-Q	buněčný typ izolovaný ze stacionárních kultur kultivovaných v tekutém glycerolovém médiu
ICL	isocitrát lyáza
NAD/NADH	oxidovaná a redukována forma nikotinamidadenin dinukleotidu
NQ buňky	buněčný typ izolovaný ze stacionárních kultur kultivovaných v tekutém glukózovém médiu
nt	nukleotidy
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDC	pyruvát dekarboxyláza
PKA	proteinkináza A
Q buňky	buněčný typ izolovaný ze stacionárních kultur kultivovaných v tekutém glukózovém médiu
REV	zpětný (primer)
ROS	reaktivní formy kyslíku
TEM	transmisní elektronový mikroskop
TOR	cíl rapamycinu
TORC1	TOR komplex 1
TUNEL	metoda detekce fragmentace DNA založená na značení konců lineárních molekul DNA
U buňky	buněčný typ izolovaný z horní vrstvy kolonie rostoucí na pevném glycerolovém médiu
YPD-L	buněčný typ izolovaný ze spodní vrstvy kolonie rostoucí na pevném glukózovém médiu
YPD-U	buněčný typ izolovaný z horní vrstvy kolonie rostoucí na pevném glukózovém médiu

1 Úvod

Kvasinky jsou jednobuněčné organismy vytvářející mnohobuněčné populace, které se do jisté míry chovají jako primitivní mnohobuněčné organismy. V laboratorních podmínkách jsou kultivovány v tekutých médiích nebo na pevných agarových médiích, kde vytvářejí mnohobuněčné kolonie. V počátečních fázích růstu jsou populace kvasinek takřka homogenní, ale v důsledku změn vyvolaných postupným úbytkem živin z média začínají buňky přizpůsobovat svůj metabolismus a fyziologii dlouhodobému přežití v nepříznivých podmínkách pro růst. Jedním ze znaků adaptace je tvorba specializovaných buněčných typů.

V koloniích rostoucích na pevném respiračním médiu byly popsány dva morfologicky a metabolicky odlišné buněčné typy, jež byly na základě své vertikální lokalizace pojmenovány jako U (upper) a L (lower) buňky (Čáp et al., 2012a). Z tekutých kultur zaočkovaných do tekutého fermentačního média bohatého na glukózu byly izolovány rovněž dva buněčné typy, které byly na základě svých vlastností označeny jako Q (quiescent) a NQ (nonquiescent) buňky (Allen et al., 2006). Pro výše zmíněné buněčné typy byl nedávno zaveden termín elders (stařešinové), jenž zahrnuje všechny typy nedělících se a chronologicky stárnoucích kvasinkových buněk kultivovaných na pevných i v tekutých médiích (Palková et al., 2014).

V rámci praktické části diplomové práce byly izolovány a charakterizovány tři nové buněčné typy. Dva z nich byly izolovány z kolonií rostoucích na pevném glukózovém médiu a byly na základě svých vlastností pojmenovány jako YPD-U a YPD-L buňky. Třetí buněčný typ byl izolován z tekutého glycerolového média a byl označen jak Gly-Q. Nově popsané typy buněk byly porovnány s již známými Q/NQ a U/L buňkami. Sledována byla jejich stresová odolnost, aktivita metabolických procesů a exprese vybraných proteinů.

Výsledky analýz přispějí k odhalení atributů nutných pro dlouhodobé přežívání kvasinek a zároveň vlivu kultivace a skladby živin v médiu na vývoj chronologicky stárnoucích kvasinkových populací. Díky mnoha konzervovaným buněčným procesům eukaryotických buněk mohou být poznatky získané studiem kvasinek aplikovány při výzkumu savčích buněk a léčbě onemocnění způsobených patogenními druhy kvasinek.

2 Literální přehled

2.1 Klidové stádium buněk

Většina buněk na Zemi se nachází v klidovém stádiu (Lewis and Gattie, 1991), které je významnou formou pro život na naší planetě stejně jako lépe probádané fáze mitotického cyklu a buněčného dělení. Toto období života se u mikroorganismů vyznačuje dočasným zastavením proliferace, přizpůsobením fyziologických procesů nepříznivým podmínkám pro růst a schopností návratu do buněčného cyklu. Takto definované stádium bývá označováno také jako G_0 fáze, což může být vzhledem k mnohobuněčným organismům zavádějící označení. U nich G_0 fáze označuje buňky nacházející se ve stálém prostředí, které opustily buněčný cyklus na základě řízeného signálu a mohou zahrnovat i plně diferenciované buňky neschopné další proliferace (De Virgilio, 2012; Gray et al., 2004).

Klidové stádium hraje esenciální roli při vývoji a přežití nejrozličnějších organismů a dokonce je prokazatelně nezbytné pro rozvoj nejrozličnějších chorob. Buňky v klidové fázi (tzv. persisters) jsou důležité pro přetrvávání a průběh infekčních mikrobiálních onemocnění, kterým je například sněž slezinná a tuberkulóza (Murray, 1999; Parrish et al., 1998). Klidové formy buněk prokaryotních i eukaryotních mikroorganismů jsou odolné a schopné přežít dlouhá období bez přísunu živin (Werner-Washburne et al., 1993). U mnohobuněčných či jednobuněčných eukaryotních organismů stráví většina buněk delší část svého života v klidovém stavu (Lewis and Gattie, 1991). U mnohobuněčných organismů má tato fáze života zásadní úlohu při pohlavní reprodukci, údržbě kmenových buněk a aktivaci buněk pro regeneraci při poranění organismu (Chang et al., 2002; Suda et al., 2005). Mnoho buněk savců a komplexních mnohobuněčných organismů po diferenciaci opouští buněčný cyklus a vstupuje permanentně do klidové fáze. V této souvislosti jsou v současné době u člověka velkým objektem zájmu neurony, u nichž dědičně dochází ke vzniku neurodegenerativního onemocnění, jakým je například Parkinsonova či Alzheimerova choroba (Sherman and Goldberg, 2001).

Hlubší porozumění environmentální a molekulární podstatě vstupu, setrvávání a výstupu z klidové fáze může přispět k výzkumu rakoviny, procesu stárnutí, léčbě nejrozličnějších onemocnění a k novým poznatkům v oblasti vývojové a evoluční biologie a ekologie (Gershon and Gershon, 2000; Gray et al., 2004; Sherman and Goldberg, 2001). Největší překážkou při studiu buněk v klidové fázi u savců je fakt, že je velmi náročné izolovat homogenní populaci buněk v dostatečném množství pro systematickou analýzu.

V roce 2006 byla objevena metoda izolace klidových buněk u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Allen et al., 2006). Ta je v současné době hlavním modelovým organismem pro

výzkum tohoto stavu (Allen et al., 2006; Aragon et al., 2006; Aragon et al., 2008; Benbadis et al., 2009; Davidson et al., 2011; Laporte et al., 2011; Li et al., 2013), jelikož sdílí s mnohobuněčnými organismy mnoho ortologních genů a konzervovaných procesů a je jedním z nejprostudovanějších eukaryotních organismů, který zároveň není náročný na kultivaci a manipulaci na všech úrovních experimentální analýzy.

2.2 Klidové stádium u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.1 Stacionární fáze kultivace

Buňky kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v klidové fázi jsou v laboratorních podmínkách izolovány z tekutého fermentačního média (2% glukóza, 1% pepton, 1% kvasničný autolyzát) po 5-7 dnech kultivace při 30 °C (Allen et al., 2006). Médium je po této době saturováno populací heterogenních buněk (více kapitola 2.3.1), které prošly přechodem na respirativní způsob metabolismu zvaným diauxické přepnutí a již se dále nedělí. Takto charakterizovaná kultura se nachází v takzvané stacionární fázi (obrázek 2.1) (Lillie and Pringle, 1980; Werner-Washburne et al., 1993; Werner-Washburne et al., 1996).

Ačkoliv populace buněk v této fázi není homogenní, i přesto má mnoho vlastností, kterými se dá charakterizovat. V porovnání s homogenní populací buněk v exponenční fázi růstu má několikanásobně sníženou úroveň transkripce a proteosyntézy, zesílenou buněčnou stěnu a zvýšenou odolnost vůči osmotickému a teplotnímu stresu (Allen et al., 2006; Choder, 1991; Werner-Washburne et al., 1996). Dále se buňky stacionární fáze vyznačují indukcí autofagie, kondenzovanými chromozomy, inhibicí degradace mRNA a akumulací zásobních látek trehalózy a glykogenu (Gray et al., 2004; Pinon, 1978).



Obrázek 2.1: Po zaočkování média bohatého na glukózu se buňky v průběhu desítek minut adaptují na podmínky vhodné pro růst a kultura se nachází v tzv. Lag fázi. Po ní následuje Log fáze (známá také jako logaritmická či exponenciální). V této fázi počet buněk v médiu logaritmicky stoupá. Kvasinky zkvašují fermentovatelné zdroje uhlíku za současné produkce ethanolu a acetátu, ačkoliv je fermentace oproti respirativní formě metabolismu energeticky méně výnosná. Tento jev se nazývá Crabtreeho efekt a dává kvasinkám kompetitivní výhodu, jelikož vyprodukovaný

ethanol inhibuje růst mnoha dalších mikroorganismů. Po přibližně jednom dni od inokulace dochází k vyčerpání fermentovatelných zdrojů uhlíku a k postupnému přechodu na metabolismus respirační. Přechod mezi fermentativním a respiračním typem metabolismu se označuje jako diauxické přepnutí. Po metabolickém přepnutí buňky zpomalují svůj růst, zpracovávají ethanol s acetátem vyprodukovaný během Log fáze a spouští procesy nezbytné k přežití dlouhodobého nedostatku živin. Během čtyř až sedmi dnů jsou zdroje uhlíku v médiu zcela vyčerpány, buňky se nedělí a kultura dosahuje stacionární fáze růstu. Obrázek převzat a upraven z (Herman, 2002).

2.2.2 Přechod do klidové formy

U prototrofních kmenů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* kultivovaných v tekutém komplexním médiu dochází k zastavení buněčného cyklu a vstupu do klidového stádia během G_1 fáze při začínajícím nedostatku různorodých zdrojů uhlíku, dusíku, fosforu nebo síry v okolním prostředí. Tento proces je důležitý v tom, aby nedocházelo k proliferaci za nepříznivých podmínek a aby buňka měla dostatek času a zdrojů pro nastavení svých fyziologických procesů pro přežití nutričně nepříznivých podmínek (Allen et al., 2006; Aragon et al., 2008; Pringle and Hartwell, 1981). Studie zaměřená na analýzu přechodu do klidového stadia na základě nedostatku rozdílných esenciálních živin (uhlík, dusík, fosfor) v médiu odhalila, že buňky v souvislosti s limitující druhem živiny nevstupují do univerzálního stádia, ale unikátně přizpůsobují svou fyziologii k maximalizování doby přežití jejího nedostatku (Klosinska et al., 2011). Zajímavostí je, že mutantní auxotrofní kmeny pro některou z esenciálních živin (například leucine, uracil, inositol či mastné kyseliny) nejsou schopny během jejich nedostatku zastavit buněčný cyklus v G_1 a zahájit klidový program, což vede k jejich hladovění a podstatnému zkrácení života (Boer et al., 2010; Henry, 1973; Keith et al., 1977).

Dlouhou dobu nebylo zřejmé, zda zahájení přechodu do klidové formy u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* je nutně spojené se zadržením buněčného cyklu v G_1 fázi (Gray et al., 2004; Herman, 2002). Studie (Wei et al., 1993) ukázala, že *cdc* mutantní kmeny mohou při vyčerpání zdrojů dusíku a uhlíku získat zvýšenou teplotní odolnost během jakékoliv fáze buněčného cyklu (*cdc* mutantní kmeny jsou na základě mutace některého z regulátorů buněčného cyklu termosenzitivní a zvýšení okolní teploty u nich způsobuje zástavu ve specifické fázi buněčného cyklu (Hartwell et al., 1973)). Termorezistence je jedním z charakteristických znaků pro klidové buňky, ovšem může být získána mnoha způsoby i proliferujícími buňkami (Lu et al., 2009; Piper, 1998). Ukázalo se, že odolnost vůči teplotnímu šoku může být indukována i pomalým růstem (Lu et al., 2009). Pokus s *cdc* mutantními kmeny byl zopakován (Laporte et al., 2011). Studie byla zaměřená na pozorování procesů specifických pro zahájení vstupu do klidové formy. Těmi jsou tvorba F-aktinových reservoárů zvaných actin bodies (aktinová tělíska) (Sagot et al., 2006) a dále relokace proteazomů z jádra do PSG granul (Proteasome storage granule) (Laporte et al., 2008). Aktinová tělíska i PSG granule se obecně tvoří při nedostatku zdrojů uhlíku a dusíku (například při přesunutí buněk z média do destilované vody) a na základě pozorování *cdc* mutantů bylo dokázáno, že se tak děje nezávisle na stádiu buněčného cyklu (Laporte et al., 2011). Studium exprese genů specifických pro klidové buňky rovněž potvrzuje tento fenomén (Aragon et al., 2008; Coller et al., 2006). G_1 fáze se zdá být pouze preferovanou. Snížení úrovně proteosyntézy, které je vlastní buňkám vstupujícím do klidové formy, prodlužuje

setrvávání v G₁ fázi, ale nemá příliš velký vliv na další fáze buněčného cyklu (Laporte et al., 2011; Popolo et al., 1982).

2.2.3 Výstup z klidového stádia

Opuštění klidové fáze a vstup do mitotického cyklu je stimulováno návratem buněk do komplexního média bohatého na nezbytné zdroje uhlíku, fosforu a dusíku. Postupně dochází k úbytku buněčné stěny, zvýšení proteosyntézy a spotřebě zásob uhlíku v podobě glykogenu a trehalózy (Werner-Washburne et al., 1993). Ačkoliv by se dalo předpokládat, že buňky zahájí návrat do buněčného cyklu na základě přítomnosti všech důležitých živin, aby předešly riziku proliferace za nepříznivých podmínek, tak se zdá, že klíčovou roli hraje pouze přítomnost živin obsahujících uhlík. Kvasinky tento risk podstupují. Přidáním glukózy ke klidovým buňkám resuspendovaným ve vodě dochází k pokusu o návrat do buněčného cyklu a smrti celé populace buněk v důsledku nepřítomnosti ostatních životně důležitých živin (Granot and Snyder, 1991, 1993). Skutečnost, že návrat klidových buněk do buněčného cyklu může být indukován pouhým přidáním energeticky využitelných zdrojů uhlíku nezávisle na ostatních esenciálních živinách, potvrzuje, již výše zmíněná práce (Laporte et al., 2011). Přidání klidových buněk do roztoku 2% glukózy vede během několika sekund k rozpadu aktinových tělísek a PSG granulí, a to stejnou rychlostí jako při přesunutí klidových buněk do komplexního média bohatého na glukózu. Návrat k buněčnému cyklu je zjevně závislý na glykolýze. Kmeny s mutací v genech hexózových transportérů či v genech nezbytných pro glykolýzu nejsou schopny opustit klidovou formu stejně jako buňky vystavené inhibitorům glykolýzy (Laporte et al., 2011).

2.2.4 Adaptace metabolismu na nepříznivé podmínky

Ještě předtím, nežli jsou všechny okolní živiny zcela vyčerpány, buňka adaptuje svůj metabolismus na období nedostatku živin. Důležitým krokem je aktivace vysoce konzervovaného procesu autofagie. K výraznému zvýšení aktivity procesu dochází především na základě nedostatku zdrojů dusíku. Jedná se o katabolický děj zodpovídající za degradaci a následnou recyklaci mnoha nepotřebných buněčných komponentů, lipidů a proteinů. Během klidového období zajišťuje především dostatek aminokyselin k syntéze proteinů důležitých pro přežití (Reggiori and Klionsky, 2013; Takeshige et al., 1992). Kvasinkové kmeny, u nichž na základě mutace neprobíhá autofagie, nejsou schopny dlouhodobě přežívat období

hladovění (Tsukada and Gallwitz, 1996). Kromě katabolických dějů dochází k syntéze ochranných sloučenin a akumulaci esenciálních prvků ve formě zásobních látek.

Pro buňky v klidové formě se zdá být vysoce důležitá tvorba lipidických tělísek (Clausen et al., 1974; Murphy and Vance, 1999). Tělíska tvoří molekuly triacylglycerolu a esterů sterolu obalené jednou vrstvou fosfolipidů (Czabany et al., 2008; Tauchi-Sato et al., 2002). Jejich význam spočívá v dlouhodobém zabezpečení energetického metabolismu buňky při absenci jakýchkoliv živin. Energie z nich je získávána β -oxidací mastných kyselin uvnitř mitochondrií. Vyskytne-li se buňka v prostředí příznivém pro růst, dochází k úplnému odbourávání těchto tukových zásob při opětovné syntéze membránových lipidů (De Virgilio, 2012; Gray et al., 2004).

Metabolismus klidových buněk si žádá dostatečnou zásobu uhlíku a fosforu. Fosfor je akumulován ve vakuolách ve formě lineárního polymeru fosfátu (polyP), jehož následná degradace je důležitá pro přežití klidových buněk v případě absence extracelulárních zdrojů fosforu (De Virgilio, 2012; Kornberg et al., 1999). Esenciální roli v tomto procesu hrají geny kódující endopolyfosfatázy a exopolyfosfatázy, jejichž ztráta vede k výraznému snížení životaschopnosti (Sethuraman et al., 2001). Uhlík je na základě úbytku živin akumulován ve formě glykogenu a trehalózy. Tyto sacharidy poskytují okamžitý zdroj energie v případě návratu k buněčnému dělení (Sillje et al., 1999). Glykogen dále energeticky zásobuje adaptaci metabolismu a syntézu trehalózy v případě úbytku živin v prostředí (Francois and Parrou, 2001). Neredukující disacharid trehalóza zastává především ochrannou funkci. Udržuje membrány v tekuté krystalické fázi během mrznutí či vysoušení (Coutinho et al., 1988; Gadd et al., 1987; Hino et al., 1990) a chrání proteiny před oxidativním poškozením (Benaroudj et al., 2001) nebo teplotním šokem (De Virgilio et al., 1994).

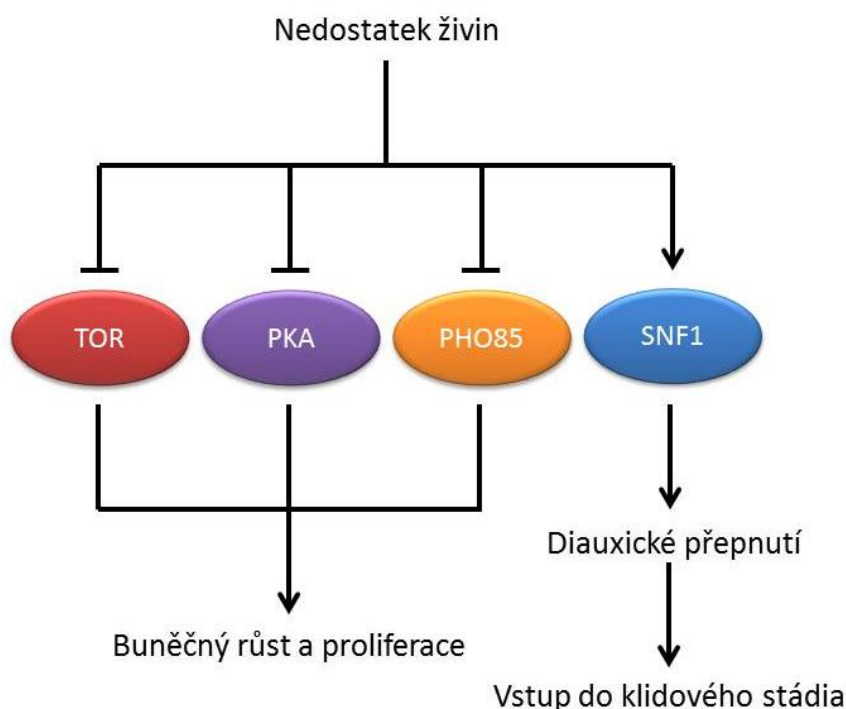
Hlavní forma energetického metabolismu, jíž je mitochondriální respirace, s sebou nese zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) poškozujících DNA, proteiny i lipidy. Klidové buňky jsou k oxidativnímu stresu velmi náchylné. Vypořádávají se s ním expresí antioxidantů glutathionu, superoxid dismutáz *SOD1* a *SOD2* a enzymy s nimi spojenými (Cyrne et al., 2003; Gray et al., 2004). Ztráta ochrany proti kyslíkovým radikálům během přežívání na respirativním metabolismu způsobuje výrazné zkrácení doby života (Longo et al., 1996; Longo et al., 1999).

Dalším důležitým ochranným prvkem klidových buněk je syntéza buněčné stěny. Tu z převážné části (cca 60% sušiny) tvoří fibrilární polysacharid β -1,3 glukan a amorfní β -1,6 glukan. Druhou nejpočetnější složkou buněčné stěny *Saccharomyces cerevisiae* jsou vysoce glykosylované mananproteiny (cca 40% sušiny). Ty se vážou kovalentní i nekovalentní vazbou na glukanovou kostru buněčné stěny, kde plní svou strukturní či enzymatickou

funkci. Nejméně početnou složku tvoří chitin, jehož podíl ve složení se pohybuje okolo 2% sušiny. Chemickou podstatou se jedná o polysacharid složený ze 100-200 molekul N-acetyl-D-glukosaminu (Lipke and Ovalle, 1998; Shimoi et al., 1998). Zastává strukturální funkci a je pomocí barvení calcofluorem vizualizován především v oblasti jizev (Pringle, 1991).

2.2.5 Signalizační kaskády

Vstup, setrvání i výstup z klidové formy je řízen rozsáhlou a propojenou signalizační sítí, jejíž součástí jsou živinami regulované signalizační dráhy (obrázek 2.2). Patří mezi ně signální kaskády řízené TOR, PKA, SNF1 a Pho85 kinázami (detailně popsané v práci (Smets et al., 2010)), které ovlivňují iniciaci procesů nezbytných pro přežití nepříznivých podmínek. TOR, PKA i Pho85 signalizační dráhy brání svou aktivitou přechodu do klidové formy a pozitivně regulují buněčný růst a proliferaci, zatímco aktivní SNF1 signalizační dráha se pozitivně podílí na výstavbě klidového programu.



Obrázek 2.2: Schéma živinami regulovaných kináz, které jsou centrálními prvky signalizačních kaskád řídících buněčný růst a adaptaci metabolismu v závislosti na kvalitě a množství dostupných živin. Aktivní TOR, PKA a Pho85p pozitivně regulují buněčný růst a proliferaci a zároveň inhibují procesy nutné k přežití při nedostatku živin, zatímco aktivita SNF1 dráhy se pozitivně podílí na přechodu na respirativní formu metabolismu a dalších procesů, jež jsou nezbytné pro vstup a setrvávání v klidové formě.

2.2.5.1 TOR signalizační dráha

TOR („Target of rapamycin“) proteiny jsou vysoce konzervované serin/threoninové kinázy. Genom kvasinek na rozdíl od vyšších eukaryotních organismů obsahuje dva TOR geny kódující paralogy Tor1p a Tor2p (Helliwell et al., 1994). Tyto proteiny jsou podjednotkami dvou funkčně a strukturně odlišných, pro život esenciálních komplexů TORC1 a TORC2. Tor1p může být součástí pouze TORC1 a v případě jeho delece může být v rámci TORC1 zastoupen proteinem Tor2p, jehož ztráta je pro kvasinku letální, jelikož nemůže být zastoupen v rámci TOR komplexu 2 kinázou Tor1p (Helliwell et al., 1994; Wullschleger et al., 2005).

TOR komplex 1 je specificky inhibován účinkem antitumorka a imunosupresoru rapamycinu, který stál za objevem a pojmenováním obou TOR kináz (Heitman et al., 1991). TORC1 dále inhibuje celá řada stresorů, jimiž je například nedostatek zdrojů obsahujících esenciální prvky, kofein, ethanol, teplotní šok, slabé organické kyseliny a další (Loewith and Hall, 2011). Nejvýraznější roli při regulaci komplexu 1 ovšem hraje dostupnost aminokyselin (Binda et al., 2009; Bonfils et al., 2012). TORC1 pozitivně reguluje buněčný růst a proliferaci fosforylací mnoha efektorů, především aktivací Sch9p kinázy a inhibicí protein-fosfatázového komplexu 2A (PP2A). Mezi buněčné procesy regulované aktivním TORC1 patří zejména inhibice autofagie a stresové odpovědi a iniciace translace, syntézy ribozomů a relokalizace vysoce selektivních permeáz pro živiny na plazmatickou membránu (Loewith and Hall, 2011; Urban et al., 2007).

TOR komplex 2 je méně probádaným z obou komplexů a podílí se na regulaci endocytózy, syntéze sfingolipidů a remodelaci aktinového cytoskeletu. Na rozdíl od TORC1 není citlivý k účinkům rapamycinu a je inhibován především stresem vyvolaným vnějším prostředím (Loewith and Hall, 2011).

2.2.5.2 PKA signalizační dráha

Hlavní komponentou PKA dráhy je serin/threoninová proteinkináza A (PKA). V buňce se vyskytuje ve formě heterotetrameru složeného kombinací dvou katalytických podjednotek Tpk1p, Tpk2p nebo Tpk3p a dvou regulačních podjednotek Bcy1p (Toda et al., 1987a; Toda et al., 1987b). Má-li buňka dostatečný přísun glukózy, zvyšuje vnitrobuněčnou koncentraci cyklického AMP (cAMP) na základě aktivity adenylátcyklázy Cdc35p. Volný cAMP se váže na regulační podjednotky Bcy1p, čímž dochází k uvolnění a aktivaci podjednotek katalytických. Ty svou činností indukují buněčný růst, syntézu ribozomálních proteinů, ribozomální DNA a

proteinů RiBi zajišťujících správnou biogenezi ribozomů. Aktivní proteinkináza A se dále pozitivně podílí na regulaci procesů vedoucích ke glykolýze a degradaci trehalózy s glykogenem a zároveň inhibuje autofagii a transkripci řady genů stresové odpovědi a syntézy zásobních a ochranných látek (Smets et al., 2010; Thevelein and de Winder, 1999).

2.2.5.3 Pho85 signalizační dráha

Fosfor patří mezi životně důležité živiny všech organismů. Je nenahraditelným prvkem biosyntézy nukleotidů a fosfolipidů. Není-li dostupný v živném médiu, buňka zastavuje proliferaci a přechází do klidové formy podobně jako při nedostatku energeticky využitelných sloučenin dusíku a uhlíku. Klíčovou roli při adaptaci na nedostatek fosfátu zastává cyklinem aktivovaná kináza Pho85p, u níž byla odhalena interakce se skupinou deseti různých cyklinů ovlivňujících její substrátovou specifitu. Nejlépe prostudovaným z nich je cyklin Pho80p. Dostatek zdrojů fosforu indukuje tvorbu komplexu Pho80p-Pho85p. Ten inhibuje aktivitu transkripčního faktoru Pho4p kontrolou jeho lokalizace. Pho4p následně není schopen aktivovat transkripci genů fosfátového metabolismu zvaných PHO. Ty se podílejí na optimalizaci příjmu zbývajících sloučenin fosforu expresí genů vysoce afinitních transportérů a dále expresí genů nezbytných pro jejich uskladnění ve formě zásobních polyfosfátů (Carroll and O'Shea, 2002; O'Neill et al., 1996; Ogawa et al., 2000). Studium kmenů mutovaných či deletovaných v genu PHO85 odhalilo, že se Pho85p kináza svou aktivitou negativně podílí na regulaci mnoha procesů typických pro přechod do klidové formy. Například inhibuje proces autofagie, expresí genů stresové odpovědi a syntézu trehalózy a glykogenu (Timblin and Bergman, 1997; Wang et al., 2001).

2.2.5.4 SNF1 signalizační dráha

SNF1 signalizační dráha je vysoce konzervovaná napříč všemi eukaryotními organismy. Centrální komponentou je heterotrimerická serin/threoninová proteinkináza SNF1 tvořená katalytickou α -podjednotkou Snf1p, jednou ze tří β -podjednotek (Sip1p, Sip2p nebo Gal83p) a γ -podjednotkou Snf4p (Hedbacker and Carlson, 2008). SNF1 kináza je pro kvasinky nezbytná, neboť zajišťuje přechod na respirativní formu metabolismu a utilizaci nefermentovatelných zdrojů uhlíku, jakými jsou například glycerol, acetát či ethanol (Carlson, 1999). K její aktivaci dochází na základě nedostatku glukózy nebo stresu vyvolaného vnějším prostředím způsobeným například: sodnými ionty, oxidativním stresem, alkalickým pH či přidáním inhibitoru TOR komplexu 1 rapamycinu (Hong and Carlson, 2007; Orlova et al., 2006; Wilson et al., 1996).

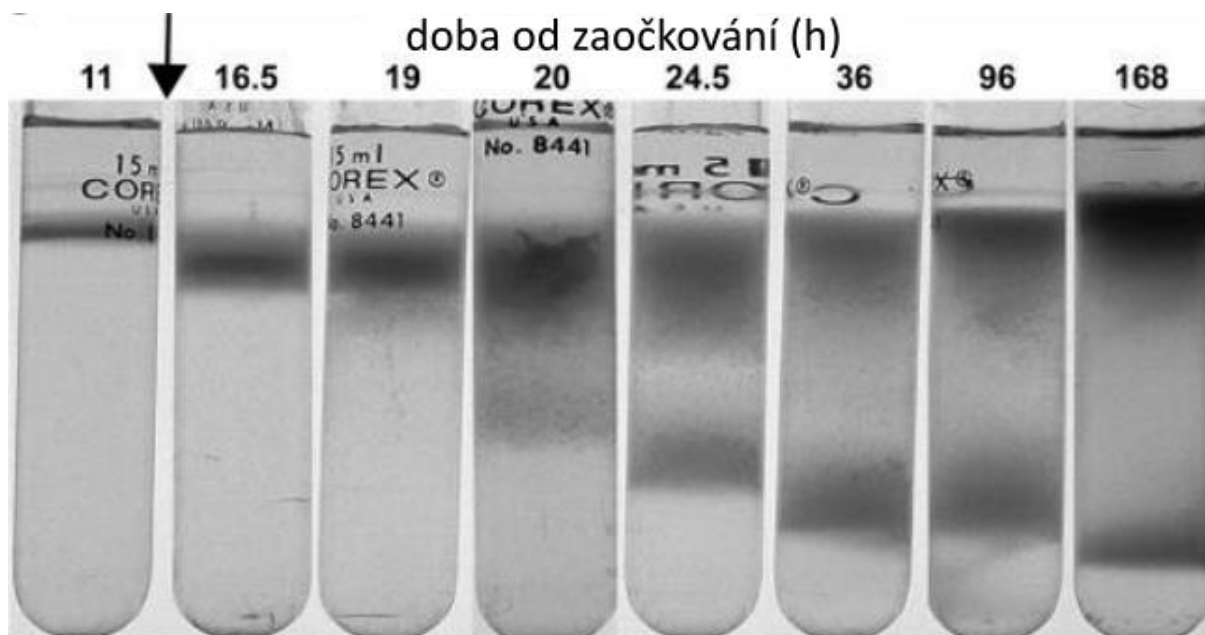
Studium exprese na celogenomové úrovni odhalilo okolo 400 genů, jejichž transkripce je závislá na aktivitě SNF1 kinázy při nedostatku glukózy v médiu. Patří mezi ně například geny metabolismu alternativních zdrojů uhlíku, glukoneogeneze, meiozy, transportu a respirace (Young et al., 2003). SNF1 ovlivňuje jejich expresi regulací transkripčních represorů a aktivátorů, ale také přímou modifikací histonu H3 (Hedges et al., 1995; Lo et al., 2001; Treitel et al., 1998). Dále se podílí na kontrole energetického metabolismu inhibicí exprese hexózových transportérů, inhibicí biosyntézy mastných kyselin a fosfolipidů, aktivací syntézy glykogenu a iniciací procesu autofagie (Kaniak et al., 2004; Shirra et al., 2001; Wang et al., 2001; Woods et al., 1994).

2.3 Diferenciace kvasinkových populací

2.3.1 Buněčné typy izolované z populace rostoucí v tekutém na glukózu bohatém médiu

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2.1., u populace kvasinek zaočkových do tekutého glukózového média můžeme ve stacionární fázi růstu pozorovat výraznou heterogenitu. Populace ve stacionární fázi byly podrobeny detailnějšímu studiu v práci (Allen et al., 2006). V ní jsou charakterizovány dva buněčné typy tvořící stacionární kulturu, dále je zde popsána metoda jejich izolace a navržen model jejich vzniku.

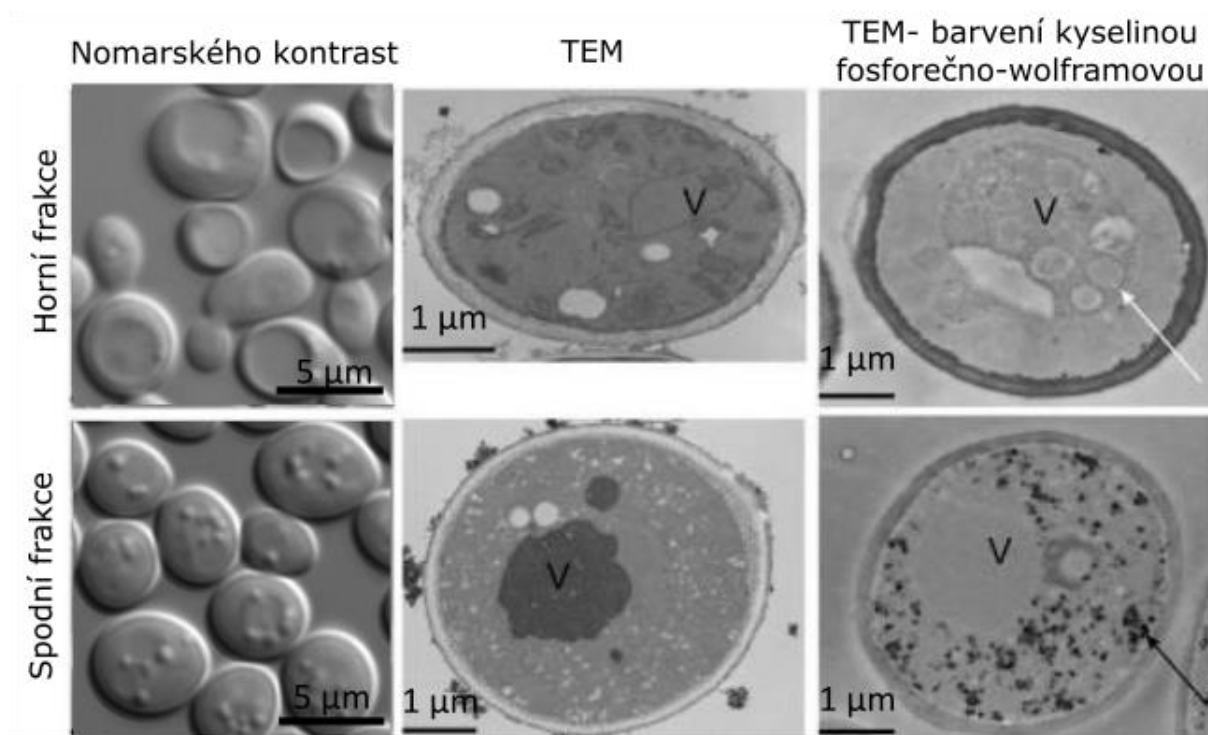
Metoda izolace buněčných typů je založena na centrifugaci v Percollovém gradientu, ve kterém jsou buňky rozděleny na základě své vznášivé hustoty. Buňky po dvanácti a méně hodinách od zaočkování jsou v exponenční fázi růstu a v hustotním gradientu vytváří jeden tenký pruh buněk (obrázek 2.3). Po dvanácti hodinách od zaočkování dochází k úbytku glukózy v médiu a je patrné postupné vertikální rozšiřování pruhu buněk. Po dvaceti a více hodinách od zaočkování jsou v gradientu patrné již dva pruhy. Každý z nich je tvořen odlišnou frakcí buněk. Horní pruh (dále ode dna centrifugační zkumavky) obsahuje buňky s menší hustotou označované na základě svých vlastností jako NQ (nonquiescent/neklidové) buňky. Buňky s vysokou vznášivou hustotou tvoří spodní pruh gradientu, který se začíná formovat během přechodu na respirační formu metabolismu, a nazývají se Q (quiescent/klidové) buňky (Allen et al., 2006).



Obrázek 2.3: Dělení populace buněk na hustotním Percollovém gradientu v průběhu chronologického stárnutí. Černá šipka značí vyčerpání glukózy, které nastává zhruba po 12 hodinách od zaočkování média. Po dvaceti hodinách se u dna centrifugační zkumavky začíná formovat spodní pruh Q buněk, jenž je už výrazně patrný po 24,5 hodinách. Převzato a upraveno z (Allen et al., 2006).

Morfologické rozdíly těchto dvou buněčných typů můžeme pozorovat pod světelným, fluorescenčním a TEM (transmisním elektronovým mikroskopem) (obrázek 2.4). Spodní frakce Q buněk tvoří populaci buněk uniformí velikosti. Tyto buňky mají na snímcích pořízených TEM zřetelně vidět buněčná jádra, na elektrony husté vakuoly a zásoby glykogenu (vizualizované barvením kyselinou fosforečno-wolframovou). Ostatní buněčné organely (jako například mitochondrie či endoplazmatické retikulum) nejsou překvapivě viditelné (Allen et al., 2006).

Horní frakce obsahuje NQ buňky různých velikostí, z nichž ty největší dosahují velikosti Q buněk. Na snímcích z TEM je patrné, že NQ buňky mají velké vakuoly obsahující váčky, což naznačuje aktivní proces autofagie (Abeliovich and Klionsky, 2001; Allen et al., 2006). Dále u nich můžeme pozorovat mitochondrie, endoplazmatické retikulum a na rozdíl od Q buněk pouhá rezidua glykogenu (Allen et al., 2006).



Obrázek 2.4: Fotografie horní a spodní frakce buněk pořízené na TEM a na světelném mikroskopu za použití nomarského kontrastu. Bílá šipka ukazuje na váček lokalizovaný uvnitř vakuoly. Písmeno V označuje vakuoly. Černá šipka směřuje na zásoby glykogenu vizualizované pomocí barvení kyselinou fosforečno-wolframovou. Převzato a upraveno z (Allen et al., 2006).

2.3.1.1 Fyziologické charakteristiky

Na základě DNA analýz a mikroskopického pozorování bylo odhaleno, že spodní frakce Q buněk pučí po návratu do komplexního média synchronně, zatímco horní frakce NQ buněk je při návratu k buněčnému dělení zcela asynchronní (Allen et al., 2006). Jelikož se Q buňky po návratu podmínek příznivých pro růst vrací synchronně do buněčného cyklu stejně jako savčí klidové buňky po přidání séra, předpokládá se, že se stejně jako jejich savčí obdoba nachází v G_0 fázi, do které vstupují během pozdní G_1 fáze buněčného cyklu (Pardee, 1974).

U obou buněčných frakcí byly prokázány rozdíly také na základě pozorování dalších fyziologických procesů. U buněk inkubovaných po dobu přibližně jedné hodiny v pufru obsahujícím fluorescenční sondu FUN-1 (2-chloro-4-[2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene]-1-phenylquinolinium iodide), která vytváří cylindrické intravakuolární struktury u metabolicky aktivních kvasinek (Essary and Marshall, 2009; Millard et al., 1997), byla za použití metody průtokové cytometrie pozorována životaschopnost a schopnost tvorby kolonií u obou frakcí buněk během jejich chronologického stárnutí. Životaschopnost NQ buněk se pohybovala po 7 a 14 dnech na více

než 85% a klesla na 47% po 28 dnech. Ovšem pouze 36% živých buněk bylo schopno proliferovat a vytvářet nové kolonie. Tento počet klesl po 14 a 21 dnech na přibližně 10% a na pouhých 3% po 28 dnech. Q buňky vykazovaly více jak 85% životaschopnost po 28 dnech. Všechny přeživší 7 dní staré buňky měli schopnost vytvářet kolonie, po 14 a 21 dnech mělo schopnost proliferovat už pouze 65% z nich a po 28 dnech 12% (Allen et al., 2006).

Jelikož buňky heterogenní kultury ve stacionární fázi růstu vykazují zvýšenou termotoleranci, byla na základě tohoto faktu u obou buněčných typů porovnávána odolnost vůči teplotnímu šoku. Buňky obou frakcí byly společně s buňkami exponenciálně rostoucích kultur vystaveny teplotě 52°C. Buňky v exponenciální fázi růstu vymřeli po několika minutách od vystavení zvýšené teplotě. NQ buňky vykazovali větší odolnost, 50% z nich bylo schopno tvorby kolonií po 10-15 minutách a 25% po 50 minutách. Ukázalo se, že nejvyšší odolnost vůči teplotnímu stresu mají Q buňky, které jsou po více jak 15 minutách při 52°C všechny 100% životaschopné (Allen et al., 2006).

Dalším fyziologickým jevem doprovázejícím buňky ve stacionární fázi růstu je akumulace volných vysoce reaktivních forem kyslíku (ROS), které indukují apoptózu (Herker et al., 2004). Akumulace ROS u Q a NQ buněk byla pozorována barvením dihydroethidinem (DHE), který je v přítomnosti superoxidu oxidován a v tomto stavu emituje červené fluorescenční záření (Stowe and Camara, 2009). Hladina kyslíkatých radikálů se u Q buněk během chronologického stárnutí příliš nezvyšovala. Po 21 dnech od zaočkování bylo obarveno pouze 15% buněk. Naproti tomu téměř každá druhá NQ buňka vykazovala přítomnost ROS už po sedmi dnech a po 21 dnech bylo ROS-pozitivních 60% populace (Allen et al., 2006).

Obě frakce buněk se v neposlední řadě odlišují v indukci apoptózy. Pomocí metody TUNEL, která se používá k vizualizaci fragmentace nukleových kyselin obarvením jejich terminálních konců, bylo prokázáno, že k fragmentaci DNA dochází mnohem častěji u NQ buněk (Allen et al., 2006). Dalšími metodami použitými pro porovnání indukce apoptózy je fluorescenční barvení pomocí Annexinu V a propidium iodidu (PI). Annexin V slouží k vizualizaci fosfatidylserinu, jehož lokalizace na vnější straně plazmatické membrány je znakem indukce apoptózy (Koopman et al., 1994). Propidium iodid se interkaluje do nukleových kyselin buněk se ztrátou membránové integrity a je používán k odlišení vitálních, apoptotických a nekrotických buněk (Riccardi and Nicoletti, 2006). Nízká indukce apoptózy u Q buněk byla pozorována také při barvení Annexinem V (pouhým 14% buněk bylo obarveno po 21 dnech od zaočkování). U NQ buněk byla odhalena značná heterogenita. Pozorovány byly čtyři typy buněk: neobarvené vitální buňky, Annexinem V obarvené buňky v časných fázích apoptózy, Annexinem V a PI obarvené buňky v pozdní fázi apoptózy a nekrotické buňky silně obarvené propidium iodidem. Celkově jevílo po 14 dnech více než 50% buněk

známky apoptózy a z toho přibližně 15% z nich bylo v pozdní fázi apoptózy (Allen et al., 2006).

Pozorování Q a NQ buněk v průběhu času vedlo k odhalení mnoha aspektů odlišujících tyto dvě frakce buněk, jež se projevují či prohlubují během chronologického stárnutí. To vedlo k otázce v jakém replikativním stáří (počítá se jako počet vypučení během chronologické délky života) se buňky obou frakcí nacházejí. U kvasinek můžeme replikativní věk určit barvením jizev na buněčné stěně pomocí calcofluoru white (Pringle, 1991). U Q buněk byla u 9% z nich pozorována pouze jedna jizva po pučení a u zbylých 91% dokonce žádná. To vedlo k názoru, že Q buňky jsou z převážné většiny nevypučené dceřiné buňky, které vznikly během prvních vln pučení po vyčerpání glukózy. Frakce NQ buněk zahrnovala buňky s nejrozličnějšími počty jizev včetně buněk nevypučených, což vedlo k vyvození závěru, že NQ buňky jsou především mateřskými buňkami, které během postdiauxické fáze produkují pannenské NQ buňky (Allen et al., 2006).

2.3.1.2 Genová exprese Q a NQ buněk

Microarray analýzy odhalily rozdíly Q a NQ frakcí také na úrovni genové exprese (Allen et al., 2006; Aragon et al., 2008). Pro NQ buňky je typická zvýšená transkripce desítek genů účastnících se transpozice Ty elementů, transpozice DNA, metabolismu DNA, DNA rekombinace a genů pozitivně regulujících růst a buněčný cyklus (Allen et al., 2006; Aragon et al., 2008). Za zmínku stojí především zvýšená akumulace transkriptů genu *AMN1*, jenž je negativním regulátorem opuštění mitotického cyklu, a dále G_2 cyklinu Clb2p, který se pozitivně podílí na průběhu buněčného cyklu (Allen et al., 2006; Surana et al., 1991; Wang et al., 2003). Zvýšená exprese těchto proteinů vedla k hypotéze, že NQ buňky nejsou schopny zadržet buněčný cyklus v G_1 fázi a vstupují do S fáze za nutričně nepříznivých podmínek a vyznačují se vysokou nestabilitou genomu, což způsobuje hojný výskyt apoptotických buněk (Allen et al., 2006; Aragon et al., 2008).

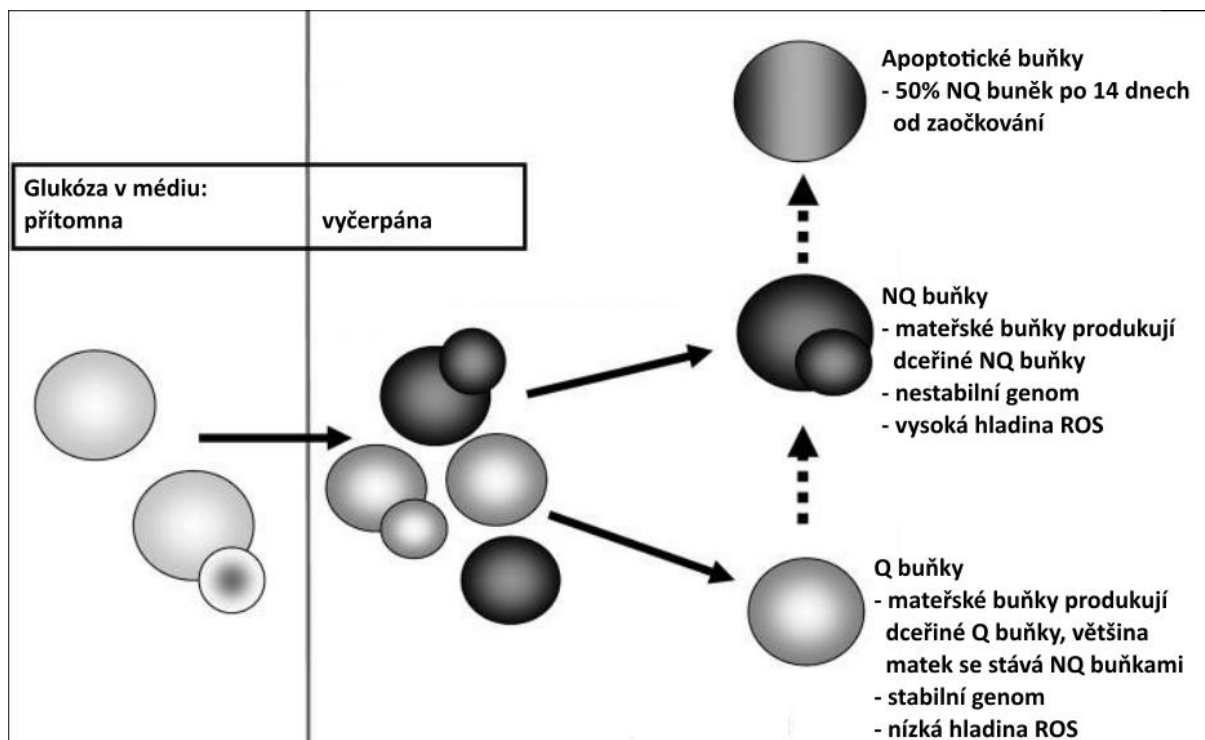
U Q buněk můžeme pozorovat zvýšený výskyt transkriptů genů účastnících se exocytózy, intracelulárního transportu, biogeneze a organizace membrán, oxidace mastných kyselin a genů odpovědi na oxidativní stres (Allen et al., 2006; Aragon et al., 2008). Zvýšená exprese posledních dvou jmenovaných skupin genů je v souladu s poznatky, které u klidových buněk poukazují na zvýšenou stresovou rezistenci a na dlouhodobé přežívání na oxidaci mastných kyselin (Allen et al., 2006; Aragon et al., 2008). Práce (Aragon et al., 2008) odhaluje bohatý výskyt 31 mRNA proteinů zahrnutých v signálních drahách shrnutých

v kapitole 2.2.5, z čehož vyplývá, že Q buňky jsou schopny efektivně regulovat a přizpůsobit své fyziologické procesy na základě extracelulárních stimulů.

Na základě výsledků rozsáhlých transkripčních analýz, byly obě frakce podrobeny analýze proteomické (Davidson et al., 2011). Zkoumáno bylo 4159 kmenů, z nichž každý měl v sekvenci odlišného genu vložen před stop kodon na jeho 3' konci reportérový GFP protein, přičemž promotor genu byl ponechán nezměněn v přirozené podobě (Davidson et al., 2011; Huh et al., 2003). Metodou průtokové cytometrie bylo identifikováno 38 kmenů, které měly odlišnou expresi GFP-fúzních proteinů u Q a NQ buněk (Davidson et al., 2011). Všechny 38 kmenů vykazovalo vyšší intenzitu fluorescence u Q buněk. Největší rozdíl intenzit byl naměřen u kmene s označeným chaperonem Hsp12p (některé další proteiny odlišující obě frakce jsou uvedeny v kapitole 2.3.4). Dvacet z GFP-kmenů mělo označen v mitochondriích lokalizovaný protein, který se u většiny z nich účastní zejména respirace. Rozdíl v množství tolika mitochondriálních proteinů mezi oběma frakcemi vedl k měření spotřeby kyslíku, jež odhalilo, že Q buňky spotřebovávají několikanásobně větší množství kyslíku než NQ buňky. Předpokládá se, že většina NQ buněk není schopna využívat nefermentovatelné zdroje uhlíku, naproti tomu Q buňky mají aktivní a plně funkční mitochondrie a jsou schopny tyto zdroje efektivně využívat (Davidson et al., 2011).

2.3.1.3 Model diferenciaci

Výsledky výzkumů Q a NQ buněk byly podmětem pro navržení modelu diferenciaci tekutých kultur zaočkovaných do média bohatého na glukózu (obrázek 2.5). O osudu buněk se začíná rozhodovat při začínajícím nedostatku glukózy před či během diauxického přepnutí. To v praxi znamená, že po přechodu na respirativní formu metabolismu Q buňky dávají vznik Q buňkám a NQ buňky mohou produkovat pouze NQ buňky (Davidson et al., 2011). Homogenní kultura jednobuněčného organismu se na základě změny nutričních podmínek diferenciuje na dva odlišné buněčné typy, z nichž každý má v rámci populace jinou úlohu. Vůči stresu vysoce odolné a genomově stabilní Q buňky zajišťují přežití a přenos genetické informace do dalších generací, zatímco genomově nestabilní NQ buňky, z nichž se po 14 dnech 50% stává apoptotickými, slouží jako dlouhodobé zásoby energie pro Q buňky (Davidson et al., 2011).



Obrázek 2.5: Model buněčné diferenciace kvasinkové kultury rostoucí v tekutém glukózovém médiu. Po vyčerpání fermentovatelných zdrojů energie je už rozhodnuto, které buňky se staly klidovými a které neklidovými. Každá buňka během období před dosažením stacionární fáze růstu produkuje buňky stejného typu. Na základě zjištění, že Q buňky izolované ze stacionární kultury jsou z 91% sesterské dosud nevypučené buňky, se předpokládá, že mateřské Q buňky se po čase stávají NQ buňkami, které se postupně stejně jako všechny ostatní NQ buňky stávají apoptotickými. Převzato a upraveno z (Davidson et al., 2011).

2.3.2 Buněčné typy izolované z populace kvasinek produkujících bioethanol v alkoholovém fermentoru

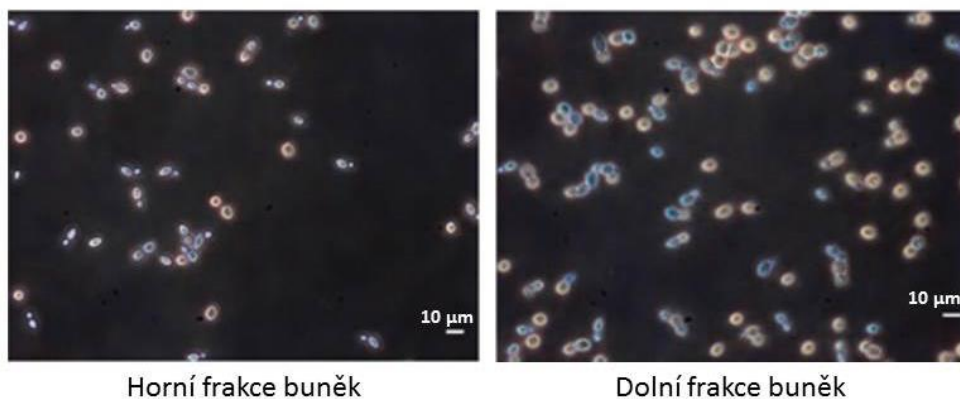
Produkce vysokého množství bioethanolu v okysličeném fermentoru se vyznačuje rozdílnou délkou produkce ethanolu a růstu buněk i přesto, že v médiu je po celou dobu kultivace udržována stabilní koncentrace kyslíku, glukózy a esenciálních živin. Dosáhne-li množství ethanolu v médiu koncentrace vyšší než 100 g l^{-1} dochází k zahájení takzvané odpřažené fáze růstu (uncoupled phase of growth), která se vyznačuje zastavením proliferace, postupným přechodem na respirativní formu metabolismu a zpomalením produkce ethanolu (Benbadis et al., 2009; Cot et al., 2007). Buňky tak reagují na příliš vysokou koncentraci ethanolu, jež ovlivňuje fyziologické vlastnosti membrán zvýšením její permeability, což je příčinnou ztráty aminokyselin, esenciálních kofaktorů, intracelulárních metabolitů a protonového gradientu (Cot et al., 2007; Leao and Van Uden, 1984a, b; Salgueiro et al., 1988). Po zahájení nespárované fáze růstu dochází k metabolickým změnám a přechodu do klidové formy podobně jako u populací rostoucích v tekutém fermentačním médiu (Allen et

al., 2006; Benbadis et al., 2009; Gray et al., 2004). Přechod do klidové formy je pravděpodobně indukován navozením stavu nedostatku živin, který je způsoben vyřazením ethanol-senzitivních transportéru glukózy a zdrojů dusíku (Cardoso and Leao, 1992; Cot et al., 2007; Leao and van Uden, 1982, 1983).

Po 45 hodinách od zaočkování kvasinek do fermentoru, kdy množství ethanolu dosahuje svého maxima (kolem 140 g l^{-1}) a buňky se již deset hodin nedělí, byly pomocí Percollového gradientu izolovány dvě frakce buněk (obrázek 2.6). Horní frakce buněk byla tvořena populací převážně vypučených buněk různých velikostí. Většina z nich byla obarvena methylenovou modří, což značí ztrátu životaschopnosti (Benbadis et al., 2009; Painting and Kirsop, 1990). Spodní frakci buněk tvořily buňky uniformní velikosti. Ze 75% se jednalo o nevypučené buňky. Zbýlých 25% byly buňky vypučené, u nichž byla pomocí barvení methylenovou modří odhalena ztráta životaschopnosti (Benbadis et al., 2009).

Podobně jako u stacionárních kultur neobsahují buňky horní frakce téměř žádné zásoby trehalózy a glykogenu, zatímco spodní frakce buněk má vysokou zásobu těchto karbohydrátů (Allen et al., 2006; Benbadis et al., 2009). Další výrazný rozdíl mezi oběma frakcemi můžeme pozorovat při měření respirace, enzymatické aktivity a úrovně exprese. Spodní frakce buněk vykazuje několikanásobně vyšší úroveň respirace a s ní spojenou zvýšenou aktivitu citrát syntázy (Cit1p) a zvýšenou expresi SNF1 kinázy než buňky frakce horní. Předpokládá se, že zastavením přísunu glukózy, přechodem na respirativní formu metabolismu a zahájením vstupu do klidové formy buňky spodní frakce předcházejí nevratnému poškození v důsledku vysoké koncentrace ethanolu a přizpůsobují se dlouhodobému přežití v těchto nepříznivých podmínkách (Benbadis et al., 2009; Cot et al., 2007).

Buněčné typy izolované z ethanolového fermentoru se dají považovat za ekvivalent Q a NQ buněk. Mají některé společné charakteristiky, ovšem mnoho fyziologických a morfologických aspektů stále nebylo podrobena analýze. Dosud byl prokázán rozdíl ve schopnosti tvorby kolonií, jež se u Q /NQ buněk liší, ale u buněk z fermentoru nikoliv (Allen et al., 2006; Benbadis et al., 2009). Počet buněk horní frakce se v průběhu odpřažené fáze snižuje, až zcela vymizí. Na základě tohoto pozorování se předpokládá, že horní frakce buněk slouží (podobně jako u kultur ve stacionární fázi růstu) jako dlouhodobá zásobárna živin pro odolnější a lépe adaptované buňky spodní frakce (Benbadis et al., 2009; Davidson et al., 2011).



Obrázek 2.6: Dvě odlišné populace buněk izolované během odpřažené fáze kultivace. Fotky jsou pořízené na světelném mikroskopu za použití fázového kontrastu. Modré buňky jsou obarveny methylenovou modří, což značí ztrátu jejich vitality. Převzato a upraveno z (Benbadis et al., 2009)

2.3.3 Diferenciace kolonií *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasinkovou kolonii tvoří v laboratorních podmínkách společenství buněk rostoucích ve vzájemném kontaktu na pevném agarovém médiu. Vznik koloniím může dát pouze jedna buňka, pak se jedná o monokolonii, či suspenze buněk, pak hovoříme o kolonii obří. Takto kultivované kvasinky nejsou na rozdíl od kvasinek kultivovaných v třepaných tekutých médiích vystaveny homogennímu prostředí s rovnoměrným přísunem živin. U kolonií dochází k tvorbě různých populací buněk, mezi kterými probíhá komunikace a látková výměna. Ačkoliv jsou kolonie kvasinek společenstvím jednobuněčných organismů, chovají se do jisté míry jako organizované mnohobuněčné organismy. Kolonie jsou dokonce schopny vzájemně komunikovat na delší vzdálenosti a ovlivňovat tak svůj růst a metabolismus (Palková and Váchová, 2006).

Komunikace mezi buňkami jednobuněčných organismů může probíhat na základě přímého kontaktu, či produkce signalizačních molekul do extracelulárního prostoru. Mezi signalizační molekuly u kvasinek patří například feromony nebo plynň amoniak (Marsh et al., 1991; Palková and Forstová, 2000; Palková et al., 1997). Amoniak hraje významnou roli při vývoji a růstu kolonie. Kvasinkové kolonie rostoucí na pevném glycerolovém médiu střídají během svého růstu acidické a alkalické fáze, které jsou doprovázeny změnami pH v blízkém okolí kolonie a změnou v produkci amoniaku (obrázek 2.7). Krátce po zaočkování nastává velmi krátká alkalická fáze (pH média 7-7,5), kterou záhy střídá fáze acidická (pH média okolo 5). Důležitý je především přechod z první acidické fáze do druhé alkalické fáze, který je charakterizován produkcí amoniaku a změnou exprese mnoha genů, jež jsou nezbytné k adaptaci na stres eskalující během první acidické fáze (Palková et al., 2002). Během pozdní

alkalické a přechodu do druhé acidické fáze můžeme u kolonie pozorovat horizontální diferenciaci mezi středem a okrají kolonie spojenou se zastavením produkce amoniaku (Váchová and Palková, 2005). Buňky na okrajích kolonie jsou plně vitální a schopné rozšiřovat kolonii, zatímco buňky ve spodní části středu kolonie vykazují apoptotické znaky (například akumulaci ROS a fragmentaci chromatinu) a poskytují živiny buňkám ve vyšších úrovních kolonie (Čáp et al., 2012a; Čáp et al., 2012b; Váchová and Palková, 2005). Studium kmenů neschopných produkce amoniaku, u nichž nedochází k alkalizaci a diferenciaci buněk mezi středem a okrají kolonie, poukazuje na důležitost této signální molekuly při diferenciaci a adaptaci kolonie na dlouhodobé přežití (Čáp et al., 2009; Váchová et al., 2009b; Váchová and Palková, 2005).



Obrázek 2.7: Střídání acidických a alkalických fází během vývoje obří kolonie kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* rostoucí na glycerolovém médiu obsahujícím pH indikátor bromkresolový purpur. Převzato a upraveno z (Váchová et al., 2009b).

2.3.3.1 Vertikální diferenciaci kolonií

V práci (Čáp et al., 2012a) byla popsána vertikální diferenciaci středu kvasinkové kolonie rostoucí na pevném glycerolovém médiu. Po zhruba 7 dnech od nakapání suspenze buněk na živné médium můžeme z obří kolonie na základě vznášivé hustoty izolovat dvě odlišné frakce buněk. Buňky s menší vznášivou hustotou byly nazvány L (lower) buňkami, jelikož se v rámci kolonie nachází blíže k agaru než U (upper) buňky, která mají vyšší vznášivou hustotu a tvoří horní vrstvu kolonie (obrázek 2.8).

Pozorování obou frakcí pod elektronovým a epifluorescenčním mikroskopem odhalilo značné rozdíly v morfologii a buněčné struktuře. U buňky z 15 dní staré kolonie mají tlustou buněčnou stěnu, bohatou zásobu glykogenu, jednu nebo několik velkých mitochondrií, několik lipidických tělísek a malé vakuoly. L buňky jsou ve srovnání s U buňkami menší, mají tenčí buněčnou stěnu, jednu velkou vakuolu, množství mitochondrií a jedno lipidické tělísko (Čáp et al., 2012a).

U obou frakcí buněk byla analyzována citlivost vůči nejrozličnějším stresorům. Patřil mezi ně teplotní šok, vystavení ethanolu a zymolyáze (enzymu degradujícímu buněčnou stěnu).

Ve všech případech vykazovaly vyšší odolnost U buňky. U této frakce byla dále naměřena třikrát menší produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). Výsledky testování naznačují, že L buňky jsou hůře adaptovány k dlouhodobému přežití, což potvrzuje jejich schopnost tvorby kolonií. Pouze 10% L buněk z 50 dní starých kolonií bylo schopno tvorby kolonie, zatímco tuto schopnost mělo 50% U buněk ze stejně starých kolonií (Čáp et al., 2012a).

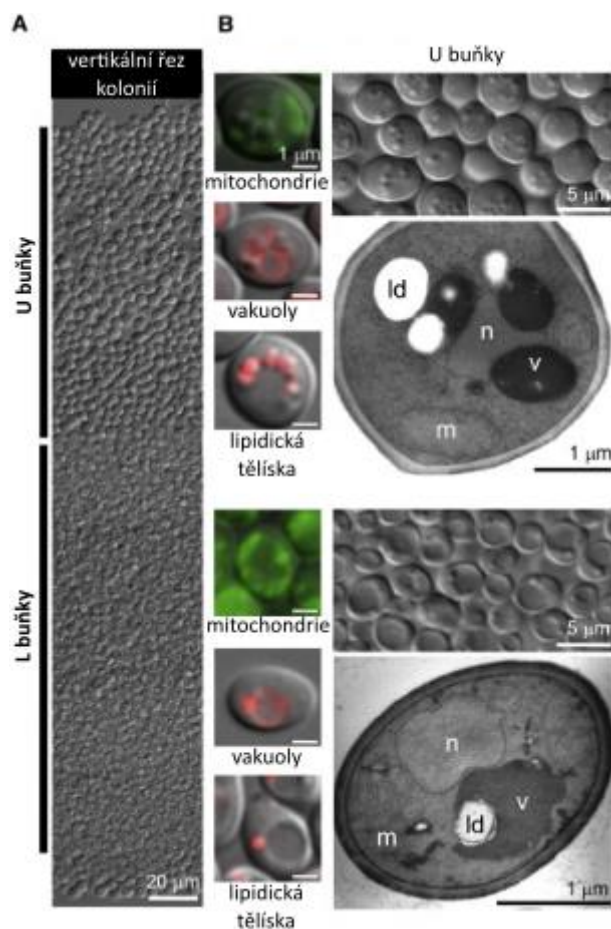
Na základě poznatků uvedených výše by se U a L buňky daly považovat za obdobu Q a NQ buněk izolovaných z tekutých stacionárních kultur. Svou morfologií a stresovou odolností si jsou tyto buněčné typy vzájemně velmi podobné. Ovšem hlubší analýza ukázala, že metabolismus U a L buněk je úzce propojen a v mnoha ohledech se od Q a NQ buněk odlišuje.

Ačkoliv jsou L buňky v přímém kontaktu s živným agarem, tak překvapivě nerostou a vykazují znaky hladovějících buněk. Jejich fyziologie naznačuje, že mají aktivovanou SNF signalizační dráhu adaptující buňky na respirativní formu metabolismu. V souvislosti s respirací pozorujeme u těchto buněk mnoho aktivních mitochondrií a zvýšenou spotřebu kyslíku, jež způsobuje akumulaci reaktivních forem kyslíku snižujících vitalitu. Předpokládá se, že úlohou L buněk je produkce živin pro odolné U buňky. L buňky exprimují geny syntézy a exportu klíčových živin (jakými jsou například glukóza či glutamin), jejichž defekt negativně ovlivňuje tvorbu horní vrstvy kolonie tvořené U buňkami. Zvýšenou úroveň exprese můžeme pozorovat také u genů účastnících se degradace buněčné stěny, jejíž degradací se uvolňují další energeticky bohaté zásoby uhlíku využitelné U buňkami.

U buňky jsou na rozdíl od svých sousedů lokalizovaných v nižších vrstvách přizpůsobeny dlouhodobému přežití v kolonii. Vykazují vysokou metabolickou aktivitu a jsou schopné dělení a růstu i po 20 dnech od nakapání na agarové médium. Na druhou stranu u nich můžeme pozorovat metabolické znaky (jako autofagie a akumulace glykogenu) typické pro hladovějící buňky. Ukázalo se, že pro správný vývoj U buněk je aktivace těchto procesů nezbytná a je pravděpodobně umožněna specifickou kombinací aktivní TOR a inaktivní PKA signalizační dráhy (Čáp et al., 2012a; Soulard et al., 2010). Na základě svého unikátního metabolického nastavení jsou U buňky schopny efektivně nakládat se zdroji dusíku v podobě aminokyselin a dále se bránit stresu způsobeným akumulací reaktivních kyslíkatých radikálů snížením respirace a mitochondriální aktivity.

Dosud nepublikované výsledky doktora Čápa, který měřil aktivitu vybraných enzymů energetického metabolismu, potvrzují metabolické rozdíly mezi U a L buňkami. L buňky mají vyšší aktivitu enzymů respirativního metabolismu (kupříkladu aktivita isocitrát lyázy je u L buněk o polovinu vyšší než u U buněk), což koreluje s vysokou úrovní jejich respirace.

U buňky mají naproti tomu dvakrát vyšší aktivitu pyruvát dekarboxylázy (klíčového enzymu fermentačního metabolismu).



Obrázek 2.8: (A) Vertikální řez 20 dní starou kolonií. (B) Fotografie U a L buněk pořízené na transmisním elektronovém mikroskopu a epifluorescenčním mikroskopu za použití Nomarského kontrastu. Mitochondrie jsou obarveny zelenou fluorescenční barvou DiOC₆(3), vakuoly fluorescenční barvou FM4-64 a lipidická tělíska fluorescenční barvou Nile Red. Písmeno „n“ na snímcích z elektronového mikroskopu označuje jádro, „v“ vakuolu, „m“ mitochondrie a „ld“ lipidická tělíska. Převzato a upraveno z (Čáp et al., 2012a).

2.3.4 Reportérové proteiny fúzované s GFP

Pro studium nejrozličnějších buněčných procesů u kvasinek (včetně diferenciací) jsou hojně využívány kmeny s vybranými proteiny označenými fúzí se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) (Čáp et al., 2012a; Davidson et al., 2011; Váchová et al., 2009a; Váchová et al., 2011). V této kapitole jsou popsány fluorescenčně značené proteiny kmenů, jež byly použity při vypracování této práce.

Cit1p

Protein Cit1p je citrát syntáza, jež katalyzuje kondenzační reakci, při které z acetyl-koenzymu A a oxalacetátu vzniká citrát. Tato syntéza je součástí Krebsova cyklu probíhajícího v mitochondriích stejně jako glyoxylátového cyklu probíhajícího v peroxizomech (Suijsa et al., 1984; Velot et al., 1999). Studie (Davidson et al., 2011) odhalila, že Cit1p je proteinem vyskytujícím se ve velké míře v Q buňkách.

Nce102p

Je nepříliš probádaným membránovým proteinem lokalizovaným v oblasti lipidických raftů. Nce102p se účastní formování eisosomů, proteinových komplexů organizujících plazmatickou membránu do specializovaných domén, dále se podílí na sekreci proteinů postrádajících klasickou signální sekvenci pro sekreci a inhibuje konjugaci (Bagnat et al., 2000; Blanda and Hofken, 2013; Frohlich et al., 2009). Studie (Davidson et al., 2011) odhalila, že Nce102p je proteinem vyskytujícím se ve velké míře v Q buňkách.

Acs1p

Protein Acs1p je acetyl-koenzym A syntáza, jež katalyzuje vznik acetyl-koenzymu A ligací acetátu a koenzymu A za spotřeby ATP. Enzym je nezbytný pro přežití buňky při kultivaci na acetátu jako jediném zdroji uhlíku a dále se podílí na acetylaci histonů (De Virgilio et al., 1992). Studie (Davidson et al., 2011) odhalila, že Acs1p je proteinem vyskytujícím se ve velké míře v Q buňkách.

Fbp1p

Fruktóza-1,6-bisfosfatáza je klíčovým enzymem glukoneogeneze, který katalyzuje vznik fruktózy-6-fosfátu z fruktózy-1,6-bisfosfátu za přítomnosti vody. Enzym Fbp1p je životně důležitý pro utilizaci nefermentovatelných zdrojů uhlíku. Jeho exprese je indukována počínajícím nedostatkem glukózy v médiu a přechodem na respirativní formu metabolismu (Hoffman and Winston, 1989, 1990; Klein et al., 1998). Po přidání glukózy do média je Fbp1p specificky degradován proteazómy či ve vakuolách v závislosti na délce nedostatku glukózy (Hung et al., 2004).

Rpl22ap

Protein Rpl22ap je součástí velké ribozomální podjednotky a v buňkách se hojně vyskytuje během exponenciální a stacionární fáze růstu (Davidson et al., 2011). Je důležitý pro zachování odolnosti proti oxidativnímu stresu. Oxidativní stres indukuje zvýšenou expresi tohoto proteinu, jehož delece či mutace způsobuje citlivost organismu k této formě stresu (Chan et al., 2012).

Ato3p

Ato3p je amoniakový transportér lokalizovaný na plazmatické membráně, který se účastní exportu amoniaku během vývoje kvasinkové kolonie (Palková et al., 2002). Studium ultratenkých řezů odhalilo, že tento protein je typický pro U buňky nacházející se v horní části kolonie (Čáp et al., 2012a).

Met17p

Met17p je enzym s O-acetylserin a O-acetylhomoserin sulfhydrylazovou aktivitou, který katalyzuje vznik homocysteinu, jež následně může sloužit jako prekurzor pro biosyntézu cysteinu a methioninu (Thomas and Surdin-Kerjan, 1997; Yamagata, 1981; Yamagata et al., 1994). Na základě práce (Čáp et al., 2012a), je Met17p považován za protein typický pro L buňky.

Pox1p

Studium ultratenkých řezů kvasinkových kolonií ukázalo, že Pox1 je typickým proteinem vyskytujícím se u U buněk (Čáp et al., 2012a). Jedná se o acyl-koenzym A oxidázu podílející se na β -oxidaci mastných kyselin v matrix peroxizomů (Hiltunen et al., 2003).

Ino1p

Inositol-3-fosfát syntáza Ino1p se podílí na syntéze inositol-3-fosfátu, který je součástí fosfolipidů a slouží také jako signalizační molekula (Ambroziak and Henry, 1994; Donahue and Henry, 1981). V rámci kvasinkových kolonií je výskyt Ino1p typický pro L buňky (Čáp et al., 2012a).

Ole1p

Ole1p alias Mdm2p je desaturáza mastných kyselin podílející se na produkci mononenasycených mastných kyselin, jejíž aktivita je nezbytná pro správnou distribuci mitochondrií během buněčného dělení (McConnell et al., 1990; Stuke et al., 1989, 1990). Tento protein je typický pro L buňky kvasinkových kolonií (Čáp et al., 2012a).

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Použité mikroorganismy

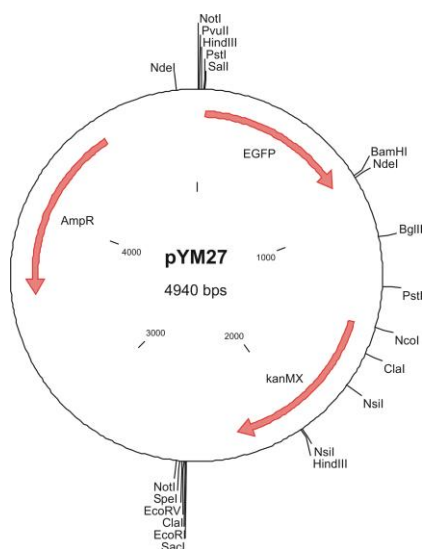
Pro vypracování této práce byl použit laboratorní haploidní auxotrofní kmen *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (MAT α , *his3* Δ , *ura3* Δ , *leu2* Δ , *lys2* Δ) získaný ze sbírky EUROSCARF a dále deset kmenů od něj odvozených s antibiotikovou rezistencí *kanMX* vůči antibiotiku Geneticinu (G418 Sulfate) a s vybraným proteinem fúzovaným s *EGFP* na jeho C-konci (tabulka 3.1).

název kmene	genotyp	zdroj
BY4742	MAT α , <i>his3</i> Δ , <i>ura3</i> Δ , <i>leu2</i> Δ , <i>lys2</i> Δ	EUROSCARF
BY4742:ATO3-EGFP	MAT α , <i>his3</i> Δ , <i>ura3</i> Δ , <i>leu2</i> Δ , <i>lys2</i> Δ , ATO3-EGFP, <i>kanMX</i>	sbírka YCG
BY4742:INO1-EGFP	MAT α , <i>his3</i> Δ , <i>ura3</i> Δ , <i>leu2</i> Δ , <i>lys2</i> Δ , INO1-EGFP, <i>kanMX</i>	sbírka YCG
BY4742:MET17-EGFP	MAT α , <i>his3</i> Δ , <i>ura3</i> Δ , <i>leu2</i> Δ , <i>lys2</i> Δ , MET17-EGFP, <i>kanMX</i>	sbírka YCG
BY4742:OLE1-EGFP	MAT α , <i>his3</i> Δ , <i>ura3</i> Δ , <i>leu2</i> Δ , <i>lys2</i> Δ , OLE1-EGFP, <i>kanMX</i>	sbírka YCG
BY4742:POX1-EGFP	MAT α , <i>his3</i> Δ , <i>ura3</i> Δ , <i>leu2</i> Δ , <i>lys2</i> Δ , POX1-EGFP, <i>kanMX</i>	sbírka YCG
BY4742:CIT1-EGFP	MAT α , <i>his3</i> Δ , <i>ura3</i> Δ , <i>leu2</i> Δ , <i>lys2</i> Δ , CIT1-EGFP, <i>kanMX</i>	vyrobené
BY4742:NCE102-EGFP	MAT α , <i>his3</i> Δ , <i>ura3</i> Δ , <i>leu2</i> Δ , <i>lys2</i> Δ , NCE102-EGFP, <i>kanMX</i>	vyrobené
BY4742:ACS1-EGFP	MAT α , <i>his3</i> Δ , <i>ura3</i> Δ , <i>leu2</i> Δ , <i>lys2</i> Δ , ACS1-EGFP, <i>kanMX</i>	vyrobené
BY4742:FBP1-EGFP	MAT α , <i>his3</i> Δ , <i>ura3</i> Δ , <i>leu2</i> Δ , <i>lys2</i> Δ , FBP1-EGFP, <i>kanMX</i>	vyrobené
BY4742:RPL22A-EGFP	MAT α , <i>his3</i> Δ , <i>ura3</i> Δ , <i>leu2</i> Δ , <i>lys2</i> Δ , RPL22A-EGFP, <i>kanMX</i>	vyrobené

Tabulka 3.1: Tabulka kmenů použitých v této práci. Sbírka YCG je označení pro sbírku laboratoře kvasinkových kolonií.

3.1.2 Použité plazmidy

Pro výrobu kmenů odvozených od BY4742 byl použit plazmid pYM27 získaný ze sbírky EUROSCARF (obrázek 3.1). Plazmid sloužil jako templát pro výrobu integračních kazet metodou PCR. Kazety byly použity při transformaci za účelem značení C-konců vybraných proteinů fúzí s *EGFP* a následné selekce díky rezistenci kódované genem *kanMX*.



Obrázek 3.1: Mapa plazmidu pYM27. Převzato z <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/pYM27.html>.

3.1.3 Použité primery

Primery použité pro výrobu integračních kazet jsou uvedeny v tabulce 3.2. Přímý primer (FWD) je tvořen z posledních 50 nukleotidů vybraného genu bez STOP kodonu a 18 nukleotidovou sekvencí vzdálené 24 nt od počátku plazmidu pYM27. Zpětný primer (REV) je tvořen 50 nukleotidy za STOP kodonem (včetně STOP kodonu) a 19 nukleotidovou sekvencí z plazmidu pYM27 z oblasti za genem *kanMX*.

gen	primer	sekvence
<i>CIT1</i>	FWD	TCTCCACCGAAAAATACAAGGAGTTGGTAAAGAAAATCGAAAGTAAGAACCGTACGCT GCAGGTCGAC
	REV	TACGTGTTTGAATAGTCGCATACCCTGAATCAAAAATCAAATTTTCCCTTA ATCGATGAATTCGAGCTCG
<i>NCE102</i>	FWD	CCAAGAGAAGAAGAACTGGCCAAGTCGGTGTCCAACCATTTCCCAAGTCGTACGCT GCAGGTCGAC
	REV	ATATTCTTAATTGAAAGTGGCGTAAAATTTAAGTTGGTGCGCTTCAATTAATCGATGAA TTCGAGCTCG
<i>ACS1</i>	FWD	CATTGTCAAACCCTGGCATTGTTAGACATCTAATTGATTCGGTCAAGTTGCGTACGCTG CAGGTCGAC
	REV	ACACGAAAAAAAAAAGTCGTCAATATAAAAAGGAAAGAAATCATCAATTAATCGATGA ATTCGAGCTCG
<i>FBP1</i>	FWD	GTTCTTCAGGTGAAATTGACAAATTTTAGACCATATTGGCAAGTCACAGCGTACGCTG CAGGTCGAC
	REV	ACTAAAGTACAGAACAAAGAAAATAAGAAAAGAAGGCGATCATTGAATTAATCGATGA ATTCGAGCTCG
<i>RPL22A</i>	FWD	TGGCCTTCTACCAAGTCACTCCAGAAGAAGACGAAGAAGAAGACGAAGAACGTACGCT GCAGGTCGAC
	REV	TTTAATTATACAAAACCTTATGCTCTATTTAAAATAATATTAATGAATTAATCGATGAATT CGAGCTCG

Tabulka 3.2: Seznam primerů použitých pro výrobu integračních kazet. Barevně podbarvené sekvence jsou homologní se sekvencemi plazmidu pYM27. Červené podbarvení značí STOP kodony.

Primery použité pro ověřovací PCR jsou uvedeny v tabulce 3.3. FWD primery byly vybrány ze sekvence značeného genu z oblasti 320-230 nt před STOP kodonem. REV primer byl vybrán ze sekvence genu pro *EGFP* z oblasti 510-530 nt od počátku plazmidu pYM27.

primer	sekvence
CIT1-FWD	TTCGCATTGAAACATTTCC
NCE-FWD	AGCTCACTCATGTAACAAC
ACS1-FWD	CGCAACAGATGATGAATTA
FBP1-FWD	CCTTTTCGCATACCCTT
RPL22A-FWD	TAAGTACTTGATCGACCAC
REV	TGATATAGACGTTGTGGCT

Tabulka 3.3: Seznam primerů použitých pro ověření správného začlenění integračních kazet do genomu.

3.1.4 Kultivační média

Na přípravu všech médií byla použita destilovaná voda, upravená deionizací systémem WATREX - ULTRAPUR (DeltaChrom).

GM pevné

- 3% (v/v) glycerol (Lach-Ner)
- 2% (w/v) agar (Dr. Kulich Pharma)
- 1% (w/v) kvasničný autolyzát (Imuna)
- 1% (v/v) 1M CaCl₂
- 1% (v/v) 5% roztok glukózy
- 1% (v/v) roztok uracilu (2 mg/ml)
- 1% (v/v) ethanol

Poznámka: Roztok kvasničného autolyzátu byl před sterilizací upraven na pH 5 pomocí HCl. Roztok glycerolu s agarem a kvasničného autolyzátu s upraveným pH byl sterilizován odděleně. Poté byly oba roztoky smíchány a byly k nim přidány sterilní roztoky uracilu, 1M CaCl₂, 5% glukózy a 96% ethanolu.

GM pevné s pH indikátorem

- GM pevné
- 0,01% (w/v) brokresolový purpur (BKP)

Poznámka: BKP byl před přidáním do média smíchán s ethanolem v poměru 10 mg BKP na 1 ml ethanolu.

YEPG pevné

- 1% (w/v) kvasničný autolyzát (FORMEDIUM)
- 1% (w/v) pepton (Biolife)
- 2% (w/v) agar (Dr. Kulich Pharma)
- 2% (w/v) glukóza

Poznámka: Roztok s glukózou byl sterilizován samostatně.

YEPG pevné s edicinem

YEPG pevné

0,002% (w/v) Edicin

Poznámka: Edicin byl do média přidán po sterilizaci. Médium bylo použito k přenášení kvasinkových kmenů z/do kultur pro dlouhodobé skladování v -80°C a k jejich přečišťování v případě kontaminace bakteriemi.

YEPG pevné s geneticinem

YEPG pevné

0,04% (w/v) Geneticin (G418 Sulfate)

Poznámka: Antibiotikum bylo do média přidáno po sterilizaci. Médium bylo použito jako selekční při výrobě nových kmenů v rámci této práce.

GM tekuté

3% (v/v) glycerol (Lach-Ner)

1% (w/v) kvasničný autolyzát (Imuna)

1% (v/v) 1M CaCl₂

1% (v/v) 5% roztok glukózy

1% (v/v) roztok uracylu (2 mg/ml)

1% (v/v) ethanol

Poznámka: Roztok kvasničného autolyzátu byl před sterilizací upraven na pH 5 pomocí HCl. Roztok glycerolu a kvasničného autolyzátu s upraveným pH byl klávován odděleně. Poté byly oba roztoky smíchány a byly k nim přidány sterilní roztoky uracylu, 1M CaCl₂, 5% glukózy a 96% ethanolu.

YEPG tekuté

1% (w/v) kvasničný autolyzát (FORMEDIUM)

1% (w/v) pepton (Biolife)

2% (w/v) glukóza

Poznámka: Roztok s glukózou byl sterilizován samostatně.

Skladovací médium

1% (w/v) kvasničný autolyzát (FORMEDIUM)

2% (w/v) pepton (Biolife)

10% (w/v) glukóza

60% (v/v) glycerol (Lach-Ner)

Poznámka: Médium bylo použito ke skladování kvasinkových kmenů při teplotě -80°C.

3.1.5 Internetové databáze a počítačové programy

Internetové databáze

Saccharomyces Genome Database (SGD)

<http://www.yeastgenome.org/>

Pubmed Medline

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

EUROSCARF

<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>

Analýza a manipulace sekvencí DNA

Sequence Manipulation Suite version 2

<http://www.bioinformatics.org/sms2/>

NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>

Chromas Lite 2.1.1

Analýza a úprava obrazu

NIS Elements (Laboratory Imaging)

Irfanwiev 4.20

3.1.6 Materiál pro práci s DNA

Standard molekulových hmotností pro horizontální DNA elektroforézu - GeneRuler DNA Ladder (MBI Fermentas)

PPP Master Mix (Top Bio)

PCR H₂O (Top Bio)

ssDNA – Salmon sperm (BioLabs)

3.2 Metodika

3.2.1 Sterilizace

Laboratorní sklo, špičky k mikropipetám, mikrozkušavky, roztoky, média a párátko byly sterilovány v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 120°C a tlaku 120 kPa. Skleněné mikrobiologické hokeyky byly sterilovány namočením do ethanolu a následným odhořením nad kahanem. Mikrobiologické kličky byly sterilovány nad plamenem kahanu. Plastové centrifugační zkumavky byly sterilovány parami kyseliny peroctové nejméně 24 hodin před použitím.

3.2.2 Skladování kvasinkových kmenů

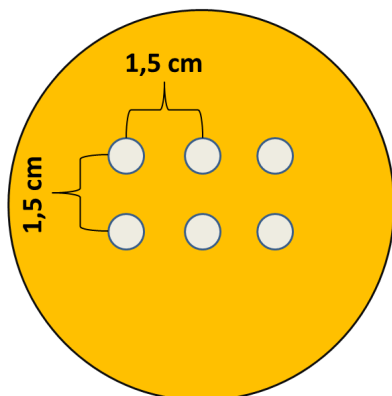
Kvasinkové kmeny byly dlouhodobě skladovány v konzervách obsahujících skladovací médium při teplotě -80°C.

3.2.3 Kultivace kvasinkových kmenů

Suspenze buněk kvasinkového kmenu byla ze skladovací konzervy přenesena sterilním párátkem na médium s edicinem. Následně byly buňky 24 hodin kultivovány v termostatu při teplotě 28°C. Po 24 hodinách byly buňky použity k zaočkování tekutých kultur nebo tvorbě obřích kolonií.

Tekuté kultury byly zaočkovány přenesením biomasy sterilní mikrobiologickou kličkou a poté byly kultivovány na horizontální třepače při 150 rpm a teplotě 28°C.

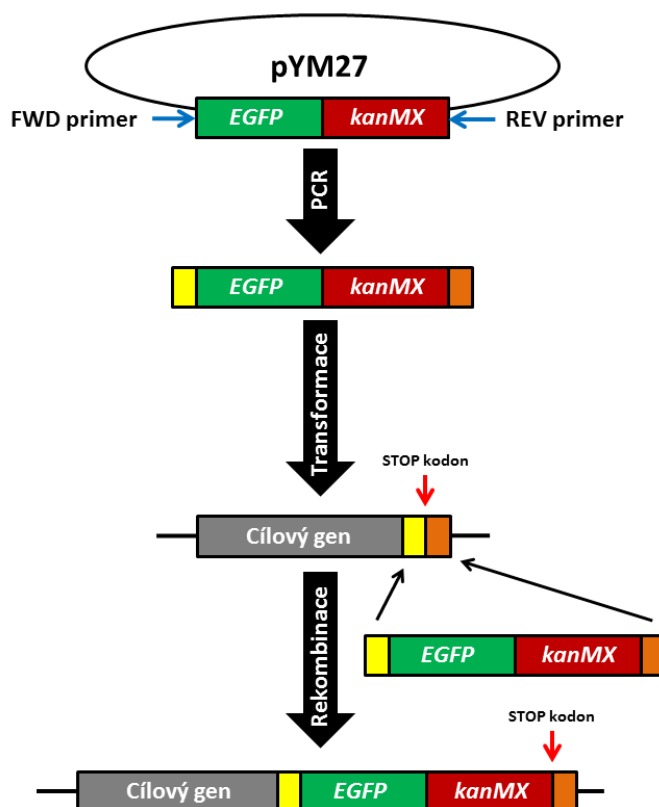
Obří kolonie byly vytvořeny nakapáním 10 μ l suspenze buněk (1 ml vody + biomasa o velikosti špendlíkové hlavičky) na agarové médium do tzv. šestic (obrázek 3.2). Kolonie byly kultivovány v termostatu při teplotě 28°C.



Obrázek 3.2: Schéma tvorby šestic obřích kolonií. Jednotlivé kapky suspenze buněk jsou od sebe vzdáleny 1,5 cm.

3.2.4 Konstrukce kmenů odvozených od BY4742

Konstrukce kmenů s vybraným genem fúzovaným s *EGFP* a s antibiotickou rezistencí kódovanou genem *kanMX* byla založena na integraci genové kazety do genomu pomocí homologní rekombinace (obrázek 3.3). Kazeta vyrobená z plazmidu metodou PCR (kapitola 3.2.4.1) byla včleněna do genomu transformací (kapitola 3.2.4.3). Správnost začlenění kazety do genomu byla ověřena pomocí metody PCR (kapitola 3.2.4.4) a sekvenace (kapitola 3.2.4.5). Posledním krokem ověření bylo vizuální porovnání fenotypu obřích kolonií nových kmenů s kmenem mateřským, čímž bylo ověřeno, zdali fluorescenční značení proteinu ovlivňuje růst a morfologii kolonie.



Obrázek 3.3: Schéma přípravy kmenů s vybraným genem fúzovaným s fluorescenčním reportérovým genem *EGFP*.

3.2.4.1 Příprava integračních kazet

Integrační kazety byly vyhotoveny metodou PCR. PCR reakce probíhala na termocykléru BIOER XP CYCLER. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 3.4 a program PCR reakce je uveden v tabulce 3.5. Po skončení PCR reakce byly produkty podrobeny elektroforetické analýze.

reakční směs	objem (μl)
FWD primer 5pmol.μl ⁻¹	4
REV primer 5pmol.μl ⁻¹	4
plazmid pYM27 1ng.μl ⁻¹	13
PPP Master Mix (Top-Bio)	32
PCR H ₂ O	11
celkový objem reakce	64

Tabulka 3.4: Složení reakční směsi pro výrobu integračních kazet.

krok	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
1	94	300	1
2	94	10	10
3	58	10	
4	72	110	
5	94	10	25
6	67	10	
7	72	120 + 5 každý další cyklus	
8	72	610	1

Tabulka 3.5: Program PCR reakce pro výrobu integračních kazet.

3.2.4.2 Elektroforetická analýza

Úspěšnost amplifikace DNA metodou PCR byla ověřena na horizontální elektroforéze. Byl použit 1% agarózový gel vyrobený přidáním 0,25 g agarózy do 25 ml TBE pufru. Agaróza byla v pufru rozpuštěna v mikrovlnné troubě a poté byla nalita do plexisklového bločku, do kterého bylo ještě před zatuhnutím přidáno 25 μ l ethidiumbromidu pro vizualizaci DNA a na který byl následně umístěn hřeben pro tvorbu jamek na nanášení vzorků. Po zatuhnutí (cca 20 minut) byl bloček přesunut do elektroforetické vaničky a byl zalit 0,5x TBE pufrem. Do jamek byly mikropipetou naneseny vzorky. Aparatura byla připojena ke zdroji jednosměrného proudu na 40 minut při napětí 90 V, což odpovídalo napětí zhruba 7 V.cm⁻¹. Gel byl po uplynutí nastaveného času pozorován a v případě potřeby vyfotografován pod UV transiluminátorem.

Složení TBE pufru:

20 mM Tris

1 mM EDTA

45 mM kyselina boritá

3.2.4.3 Transformace kvasinkových buněk

Pro transformaci kvasinkových buněk byla použita LiAc/ssDNA/PEG metoda publikovaná v práci (Gietz and Woods, 2002). 20 ml tekutého YEPG média bylo zaočkováno buňkami kmene BY4742 a poté bylo inkubováno přes noc při teplotě 28°C. Druhý den byla určena koncentrace buněk v médiu a kultura byla naředěna do objemu 50 ml totožného média tak, aby koncentrace buněk v kultuře odpovídala 5x10⁶ buněk/ml. Kultura byla poté aerobně kultivována 4 hodiny (2 generační doby). Po 4 hodinách byla kultura 7 minut stáčena při 22°C a 3000 rpm. Poté byly buňky dvakrát promyty sterilní vodou a stočeny za stejných

podmínek. Promyté buňky byly naředěny na koncentraci 2×10^9 buněk/ml a na jednu transformační směs bylo použito 100 μ l suspenze (10^8 buněk). Transformační směs se skládala ze 100 μ l připravených buněk, 34 μ l transformační kazety, 36 μ l 1M LiAc, 240 μ l 50% PEG, 40 μ l H₂O a 10 μ l ssDNA (jednořetězcová DNA, single stranded DNA). ssDNA byla připravena povařením roztoku DNA z lososího mlíčí (10 mg/ml) po dobu 5 minut a ihned přenesena na led. Po namíchání směsi byly buňky inkubovány 40 minut v termobloku při teplotě 42°C. Poté byla směs stáčena při 6000 rpm po dobu 30 sekund. K buňkám byl přidán 1 ml YEPG média a byly 2 hodiny kultivovány při 28°C, aby nastala exprese genu rezistence vůči antibiotiku selekčního média. Buňky byly poté stáčeny při 6000 rpm po dobu 30 sekund a vysety na selekční médium s Geneticinem (G418 Sulfate).

3.2.4.4 Ověření nových kmenů pomocí PCR

Integrace transformačních kazet do genomu nově vyrobených kmenů byla ověřena pomocí PCR. PCR reakce probíhala na termocykléru (Mini Cyclertm MJ Research). Pro namíchání reakční směsi byly použity ověřovací primery (tabulka 3.3) a DNA izolovaná metodou popsanou v kapitole 3.2.4.8. Kompletní složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 3.6 a PCR program je uveden v tabulce 3.7.

reakční směs	objem (μ l)
FWD ověřovací primer 5pmol. μ l ⁻¹	1
REV ověřovací primer 5pmol. μ l ⁻¹	1
izolovaná DNA	1
PPP Master Mix (Top-Bio)	5
PCR H ₂ O	2
celkový objem reakce	10

Tabulka 3.6: Složení reakční směsi pro ověřovací PCR.

krok	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
1	94	180	1
2	94	30	35
3	51	30	
4	72	90	
5	72	300	1

Tabulka 3.7: Program ověřovací PCR reakce.

3.2.4.5 Ověření nových kmenů pomocí sekvenace DNA

K ověření kmenů metodou sekvenace byly využity produkty ověřovací PCR s tím rozdílem, že reakční směs byla namíchána ve čtyřnásobném objemu (40 μ l). Po amplifikaci byla DNA určená k sekvenaci přečištěna dle návodu v kitu PCRExtract Mini Kit 5 Prime. Po přečištění byla změřena její koncentrace na mikrokapilárním spektrofotometru NANODROP 100. Podle pravidel Laboratoře sekvenace DNA PřF UK byl připraven vzorek o objemu 8 μ l obsahující 1 μ l 5pmol. μ l⁻¹ REV ověřovacího primeru (viz tabulka 3.3) a přečištěnou templátovou DNA jejíž množství přidané do vzorku se lišilo v závislosti na její koncentraci (výsledná koncentrace templátové DNA v připraveném vzorku činila 40-80 ng). Vzorek byl na požadovaný objem doplněn PCR H₂O. Výsledek obdržенý z Laboratoře sekvenace DNA byl analyzován v programu Chromas Lite 2.1.1 a porovnán s očekávanou sekvencí v internetovém nástroji NCBI BLAST.

3.2.4.6 Izolace genomové DNA

Izolace DNA používána v rámci této práce byla založena na protokolu publikovaném v práci (Looke et al., 2011). Biomasa buněk o velikosti špendlíkové hlavičky byla přenesena do 100 μ l extrakčního roztoku. Poté byla směs buněk a extrakčního roztoku 15 minut inkubována při teplotě 70°C na termobločku. Po inkubaci bylo k směsi přidáno 300 μ l 96% ethanolu, vše bylo důkladně promícháno a následně stáčeno po dobu 3 minut při 15 000 g. K peletu bylo přidáno 100 μ l vody a byl uskladněn pro další použití.

Složení extrakčního roztoku:

200 mM LiAc

1% (w/v) SDS

3.2.5 Měření optické denzity buněčných kultur

Optická denzita kultur byla měřena na spektrofotometru v plastových kyvetách s optickou dráhou 1 cm při vlnové délce 600 nm. Před zahájením měření bylo vždy odečteno pozadí média.

3.2.6 Sledování mikroskopických preparátů

Mikroskopické preparáty a řezy kolonií byly pozorovány na epifluorescenčním mikroskopu Leica DMR. Pro pozorování buněk ve viditelném světle byl použit Nomarského kontrast a v případě pozorování buněk GFP kmenů byl použit příslušný excitační a emisní filtr. Obraz byl snímán monochromatickou kamerou JENOPTIK Progres®. Měřítka a doba expozice je uvedena u jednotlivých snímků.

3.2.7 Výroba ultratenkých řezů kolonií

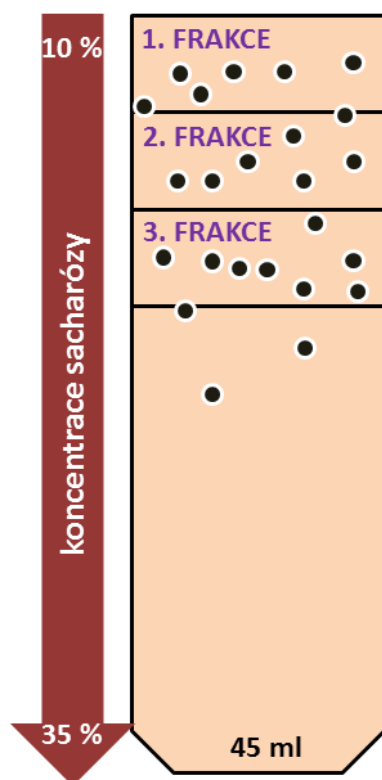
Kvasinková kolonie byla skalpelem vyříznuta z agaru a poté vložena do 5ml plastové komůrky, kde byla zalita teplem rozpuštěným roztokem 2,5% agarózy vychladlým na cca 45-50°C. Po zatuhnutí byl vzorek rozpůlen příčným řezem. Z připraveného vzorku byly na mikrotomu Leica VT 1200S krájeny příčné řezy o tloušťce 20 µm.

3.2.8 Barvení buněčných jader

Pro obarvení buněčných jader byl použit roztok (5 µg/ml) fluorescenční barvy Hoechst 33342 (Molecular Probes). Buňky byly permeabilizovány 20% ethanolem po dobu 5 minut.

3.2.9 Dělení buněk na sacharózovém gradientu

Sacharózový gradient byl připraven v přístroji na výrobu gradientů Hoefer™ SG 50 Gradient Maker postupným smícháním 22,5 ml roztoku 10% sacharózy (w/v) s 22,5 ml roztoku 35% sacharózy (w/v). Na povrch gradientu byla mikropipetou opatrně nakapána suspenze buněk o objemu 700 µl. Gradient s buňkami byl v centrifuze s výklopným rotorem stáčen 5 minut při 1050 rpm. Zrychlení a zbrždění bylo nastaveno na minimum, aby během centrifugace nedošlo ke zničení gradientu. Ze stočeného gradientu byly postupně odpipetovány 6ml frakce buněk (obrázek 3.4). Izolované frakce byly poté stáčeny 5 minut při 4000 rpm a připraveny pro další analýzu resuspendováním v 1 ml vody.



Obrázek 3.4: Schéma sacharózového gradientu stočeného po přidání suspenze buněk. Zobrazené frakce buněk mají objem 6 ml.

3.2.10 Měření účinku zymolyázy

Účinek zymolyázy byl měřen na spektrofotometru OPTIZEN jako úbytek optické denzity v čase. Do plastové kyvety s optickou dráhou 1 cm byl přidán roztok se zymolýzou o objemu 1 ml a množství buněk odpovídající $OD_{600} \sim 0,5$ (5×10^6 buněk/ml). Poté byla každých 15 vteřin měřena změna optické denzity po dobu 6 minut.

Složení zásobního roztoku obsahujícího zymolýzu:

50 ml 50mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 pufru (pH=7,8) vyrobeného smícháním 45,75 ml 50mM K_2HPO_4 a 4,25 ml 50mM KH_2PO_4

7,8 μ l 0,2mM merkaptoethanolu

12,5 mg zymolýzy (20 000 U/g)

3.2.11 Měření intenzity emisního záření

Intenzita emisního záření GFP kmenů byla měřena na spektrofleurimetru HORIBA JOBIN YVON FluoroMax-P s nastavením shrnutým v tabulce 3.8. Vzorky byly měřeny v plastových kyvetách o objemu 4 ml s optickou dráhou 1 cm. Množství buněk jednoho vzorku odpovídalo $OD_{600} = 0,5$ (cca 5×10^6 buněk/ml). Pro další analýzu byla použita hodnota emisního maxima, které je měřeno při vlnové délce 509 nm. Od výsledných hodnot byla vždy odečtena hodnota autofluorescence.

vlnová délka excitačního záření (nm)	šíře štěrbin (nm)
475	10
vlnová délka měřeného emisního záření (nm)	šíře štěrbin (nm)
500-530	5

Tabulka 3.8: Nastavení spektrofleurimetru.

3.2.12 Měření respirace

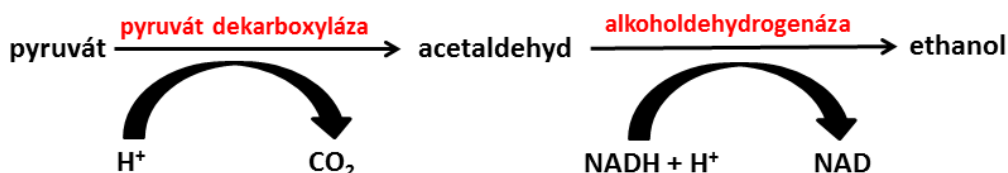
Úroveň respirace buněčných kultur byla měřena na respirometru Strathkelvin Instrument Oxygen meter s 1ml měřicí celou MT200 temperovanou a pomocí vodní lázně s externím oběhem trvale udržovanou na teplotě 30°C. Do komůrky respirometru o objemu 1 ml byla po důkladném promytí napipetována demineralizovaná voda. Po ustálení hladiny kyslíku bylo do komůrky přidáno 2,5 mg buněk v 25 μ l vody a po zhruba dvou minutách 50 μ l 96% ethanolu. V programu Strathkelvin 782 Data Analysis Module byl zaznamenáván úbytek kyslíku po přidání suspenze buněk a poté i po přidání ethanolu. Následně byla z programu vygenerována data pro další analýzu.

3.2.13 Analýza teplotní odolnosti

Do mikrotitrační destičky pro PCR reakce bylo do jamky číslo 1 napipetována 100 μ l suspenze buněk o koncentraci 10 mg buněk/1 ml. Do následujících pěti komůrek byla vložena vždy desetina předchozího objemu do 90 μ l vody. Tímto byla vytvořena desetinásobná sestupná ředící řada ve směru 1→6. Mikrotitrační destička byla po nanesení vzorků vložena do termocykléru BIOER XP CYCLER. V něm byly vzorky vystaveny konstantní teplotě 52°C. Vzorky byly po 45 a 90 minutách naneseny na YEPG médium kapkovou metodou (1 kapka= 10 μ l). Jako kontrola sloužily vzorky nakapané na médium před vystavením teplotnímu šoku.

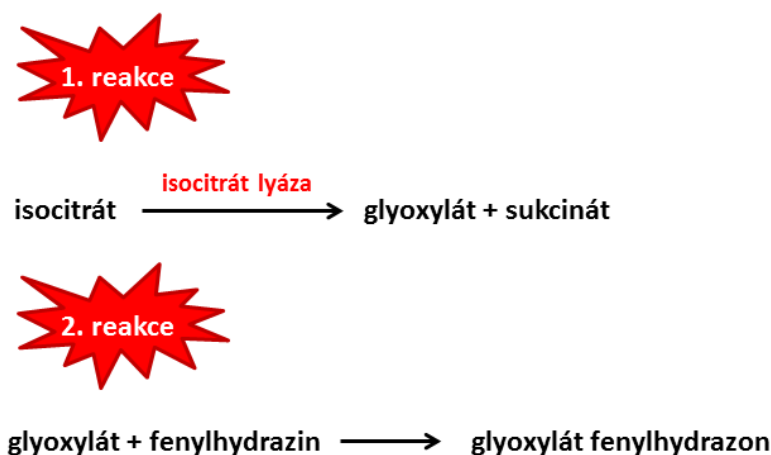
3.2.14 Analýza enzymatické aktivity

V rámci této práce byla měřena aktivita dvou enzymů energetického metabolismu. Prvním z nich byl enzym fermentativní dráhy pyruvát dekarboxyláza (obrázek 3.5). Aktivita tohoto enzymu byla měřena jako úbytek NADH v čase.



Obrázek 3.5: Schéma alkoholového kvašení.

Druhým analyzovaným enzymem byla isocitrát lyáza, která je komponentou glyoxylátového cyklu, jenž je součástí respirativního způsobu získávání energie u organismů s omezenými zdroji uhlíku. Aktivita tohoto enzymu byla měřena jako nárůst koncentrace glyoxylát fenyldrazonu (obrázek 3.6).



Obrázek 3.6: Schéma reakcí probíhajících ve vzorku během měření isocitrát lyázové aktivity. Prvním krokem je reakce glyoxylátového cyklu katalyzovaná isocitrát lyázou, kdy z isocitrátu vzniká glyoxylát a sukcinát. Druhým krokem je kondenzační reakce, při které z glyoxylátu a fenyldrazinu vzniká glyoxylát fenyldrazon. Nárůst glyoxylát fenyldrazonu můžeme měřit na spektrofotometru jako nárůst absorbance při vlnové délce 324 nm.

3.2.14.1 Izolace enzymů

Zhruba 50-100 µg biomasy buněk bylo resuspendováno v 300 µl extrakčního pufru a přeneseno do zkumavky se skleněnými kuličkami o průměru 425-600 µm (po smíchání

s extrakčním pufrem byly buňky stále drženy na ledu). Buňky byly pomocí skleněných kuliček o průměru 425-600 µm rozbity v přístroji FASTPREP FP 120 čtyřmi cykly trvajících 20 sekund (mezi jednotlivými cykly byly buňky na dobu 2 minut přeneseny zpět na led). Vzorek byl poté přenesen do nové zkumavky bez kuliček pomocí mikropipety se seříznutou špičkou. Kuličky byly ještě jednou promyty 100 µl extrakčního pufru, který byl po promytí přidán ke vzorku. Vzorek s lyzáty byl dále stáčen 11 minut při 4°C a 14 000 rpm. Supernatant obsahující enzymy byl přenesen do nové zkumavky.

Složení extrakčního pufru:

20 mM HEPES (pH 7,1)

1 mM dithiotreitol (DTT)

100 mM KCl

40 µl/ml PIC (Proteinase inhibitor cocktail; Roche)

10 µl/ml AEBSF (4-(2-Aminoethyl) benzensulfonyl fluorid hydrochlorid; Sigma)

3.2.14.2 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů v lyzátu byla stanovena použitím Bio-Rad Protein Assay (čínidlo Bradfordové). U vzorku o objemu 1 ml byla v plastové kyvetě s optickou dráhou 1 cm změřena absorbance při 595 nm (před měřením bylo vždy odečteno pozadí vzorku bez lyzátu). Po změření koncentrace proteinů byly lyzáty naředěny na shodnou koncentraci na základě standartní koncentrační křivky, kdy $ABS_{595}=0,3$ je přibližně rovno koncentraci proteinů 10 µg/ml.

Složení vzorku:

20% (v/v) Bio-Rad Protein Assay

0,1% (v/v) lyzát

79,9% (v/v) voda

3.2.14.3 Měření aktivity pyruvát dekarboxylázy

Aktivita enzymu byla měřena na spektrofotometru OPTIZEN jako pokles absorbance v čase při vlnové délce 375 nm. Vzorek byl analyzován v kyvetě s optickou dráhou 1cm. Do reakční směsi o objemu 500 µl bylo před zahájením měření přidáno 10 µl lyzátu.

Složení reakční směsi:

187mM kyseliny citrónové (upraveno na pH=6)

33mM pyruvátu

0,11mM NADH

4 U/ml ADH (kvasinková alkoholdehydrogenáza; Sigma)

3.2.14.4 Měření aktivity isocitrát lyázy

Aktivita enzymu byla měřena na spektrofotometru OPTIZEN jako nárůst absorbance v čase při vlnové délce 324 nm. Vzorek byl analyzován v kyvetě s optickou dráhou 1cm. Do reakční směsi o objemu 475 μ l bylo před zahájením měření přidáno 25 μ l lyzátu.

Složení reakční směsi:

79% (v/v) roztok 100mM imidazolu (pH=7,1), 200mM KCl, 2mM EDTA, 10mM MgSO₄

10,5% (v/v) 0,2 M fenyldrazin

10,5% (v/v) 50mM DL-isocitrát

4 Cíle práce

- Vytvořit z dostupné literatury přehled o diferenciaci laboratorních kvasinkových kmenů.
- Ověřit, zda dochází k diferenciaci u populací kvasinek kultivovaných v tekutém respiračním a na pevném fermentačním médiu, a porovnat je s dosud známými buněčnými typy.
- Charakterizovat kolonie kmene BY4742 rostoucí na pevném glukózovém médiu.
- Zkonstruovat pět nových kmenů s označeným vybraným proteinem fúzí s EGFP.
- Sledovat expresi, lokalizaci a intenzitu fluorescence GFP značených proteinů u všech doposud izolovaných buněčných typů.
- Porovnat stresovou odolnost a vybrané metabolické procesy izolovaných buněčných populací.

5 Výsledky

5.1 Charakteristika buněčných populací izolovaných z odlišných kultivačních médií

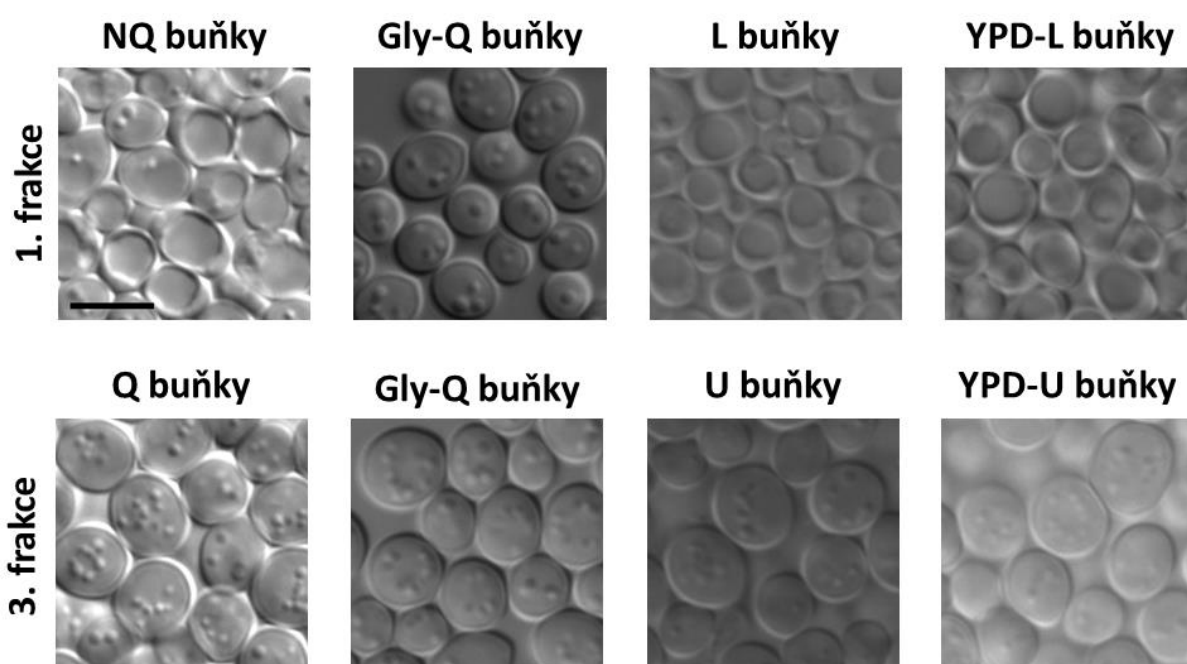
V práci (Allen et al., 2006) byly na základě vznášivé hustoty z tekutého fermentačního média izolovány dva odlišné buněčné typy, obdobným způsobem byly izolovány dva buněčné typy z kolonií rostoucích na pevném glycerolovém médiu (Čáp et al., 2012a). Objektem zájmu této práce bylo ověřit, zdali dochází k diferenciaci buněk také u tekutého glycerolového média a pevného glukozového média, a následně nově izolované buněčné typy porovnat s již popsány mi buněčnými typy.

Pro izolaci buněk na základě vznášivé hustoty jsou známy dvě metody. První z nich je dělení na Percollovém gradientu použita v práci (Allen et al., 2006; Benbadis et al., 2009) a druhou je izolace na sacharózovém gradientu použita v práci (Čáp et al., 2012a). V první fázi výzkumu bylo nutno zjistit, dá-li se metoda dělení na sacharózovém gradientu aplikovat v případě tekutých kultur a metoda dělení v Percollovém gradientu v případě kolonií. Na základě pozorování izolovaných frakcí buněk se ukázalo, že obě metody se dají použít pro kolonie i tekuté kultury. Z obou metod byla nakonec vybrána levnější, časově méně náročná metoda dělení na sacharózovém gradientu. Metoda ovšem vyžaduje manuální preciznost a rychlé provedení, jelikož sacharóza může u buněk po delší době indukovat výstup z klidové formy. Založena je na postupném odebírání tří 6 ml frakcí buněk z gradientu o objemu 45 ml (více kapitola 3.2.9).

Dělení kolonií se ukázalo být nejefektivnější po 14 dnech od nakapání na agarové médium. V této době jsou již kolonie plně diferenciovány. Dělení kolonií rostoucích na glukózovém médiu ukázalo, že 1. frakce buněk vyskytující se nejbliž e ústí centrifugační zkumavky se svou morfologií a heterogenitou velikostí shoduje s L buňkami a 3. frakce buněk odebraná z místa nejbliž e ke dnu morfologicky odpovídá Q buňkám (obrázek 5.1). 2. frakce po mikroskopické analýze obsahovala mix obou typů buněk a to i v případě buněk z glycerolového média. Nově izolované buněčné typy byly kvůli identifikaci při další analýze pojmenovány jako YPD-U a YPD-L (pojmenování vychází ze zkratky anglického označení média **Y**east extract, **P**epton, **D**extrose).

Výtěžek Q a NQ buněk z tekutých stacionárních kultur byl optimální po sedmi dnech. První odebraná frakce buněk obsahovala NQ buňky, 2. frakci tvořil mix Q a NQ buněk a 3. frakce obsahovala pouze Q buňky. Dělení stejně starých kultur rostoucích v glycerolovém médiu odhalilo homogenitu populace. Buňky sice byly rozděleny na základě své vznášivé

hustoty, ovšem jejich morfologie byla u všech frakcí podobná Q buňkám a k dělení docházelo nejspíše na základě rozdílu ve velikosti. Pozdější analýza stresové odolnosti frakcí zvrchu a zespod centrifugační zkumavky ukázala, že se jedná o shodný typ buněk. Mikroskopická analýza nerozdělených stacionární glycerolové kultur i kultur rozdělených po 5 a 15 dnech neodhalilo přítomnost žádného buněčného typu, který by se podobal například NQ, L, či YPD-L buňkám. Buněčný typ vyskytující se v glycerolovém tekutém médiu byl pro identifikaci během dalších pokusů nazván na základě kultivačního média a své morfologické podobnosti s Q buňkami jako Gly-Q.

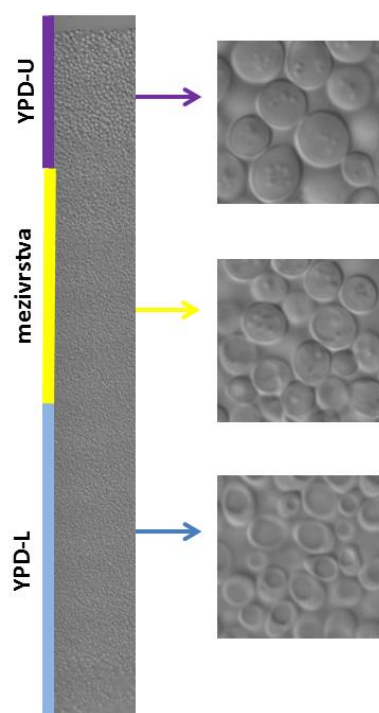


Obrázek 5.1: Snímky izolovaných buněčných typů. Z obrázku je patrné, že morfologie buněk z jednotlivých frakcí tekutého glycerolového média se neliší. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μm .

5.2 Charakterizace obřích kolonií kmene BY4742 rostoucích na pevném glukózovém médiu

Vertikální a horizontální vývoj obřích kolonií byl studován a popsán na populacích kvasinek rostoucích na pevném glycerolovém médiu (kapitola 2.3.3). Jedním z cílů této práce bylo popsat vertikální diferenciaci obřích kolonií rostoucích na glukózovém médiu a porovnat jejich morfologii s koloniemi rostoucími na glycerolovém médiu.

Kolonie rostoucí na glycerolovém médiu jsou začátkem sedmého dne zřetelně rozděleny do dvou vrstev, z nichž horní je tvořena U buňkami a spodní L buňkami. Po dalších sedmi dnech růstu se tloušťka vrstvy U buněk takřka zdvojnásobí, zatímco tloušťka L buněk

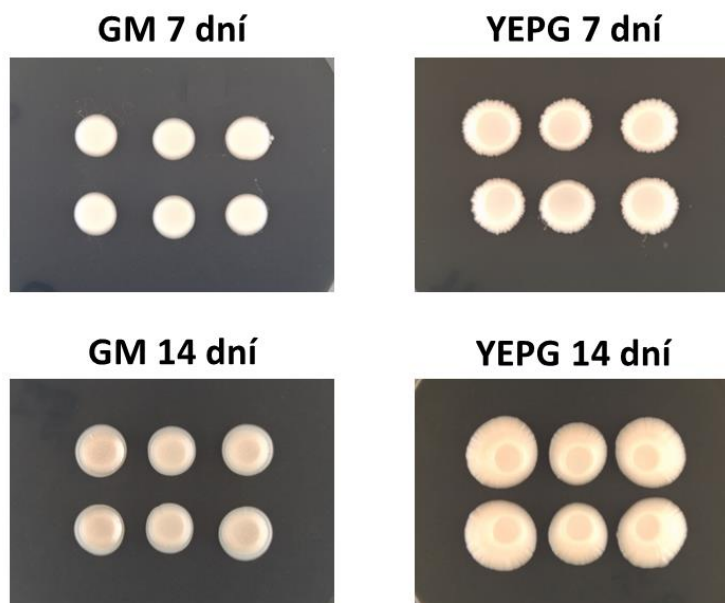


se zvýší jen o několik desítek procent (Čáp et al., 2012a).

U kolonií rostoucích na glukózovém médiu byly na řezech 14 dní starých kolonií patrné tři vrstvy buněk (obrázek 5.2). Horní z nich je tvořena vrstvou YPD-U buněk a spodní je tvořena YPD-L buňkami. Prostřední vrstvou je tzv. mezivrstva, jež je tvořena kombinací dvou typů buněk. První z nich se vyznačuje tlustou buněčnou stěnou a lipidickými tělísky a je morfologicky podobný YPD-U buňkám. Druhý buněčný typ má podobně jako YPD-L buňky velkou propadlou vakuolu. Studium 7 dní starých kolonií ukázalo, že mezivrstva není po této době vytvořena.

Obrázek 5.2: Vertikální řez 14 dní starou kolonií rostoucí na pevném glukózovém médiu. Kolonie je rozdělena do tří vrstev, z nichž prostřední „mezivrstva“ je tvořena dvěma typy buněk.

S typem média je spojena nejen rychlost růstu kolonie, ale také její morfologie. Po sedmi dnech od nanesení suspenze buněk do šestic jsou kolonie rostoucí na glukóze viditelně větší a mají na rozdíl od kolonií s hladkými okraji rostoucích na glycerolu okraje mírně zvlněné. Po čtrnácti dnech je rozdíl velikostí ještě výraznější a u kolonií rostoucích na glukóze můžeme pozorovat zvlněné okraje a výraznou prohlubeň v centrální části kolonie (obrázek 5.3).



Obrázek 5.3: Snímky 7 a 14 dní starých obřích kolonií. U pravého dolního obrázku můžeme u jednotlivých kolonií tvořících šestici pozorovat výrazné prohlubně v jejich centrální části.

5.3 Konstrukce kmenů s vybranými proteiny fúzovanými s EGFP

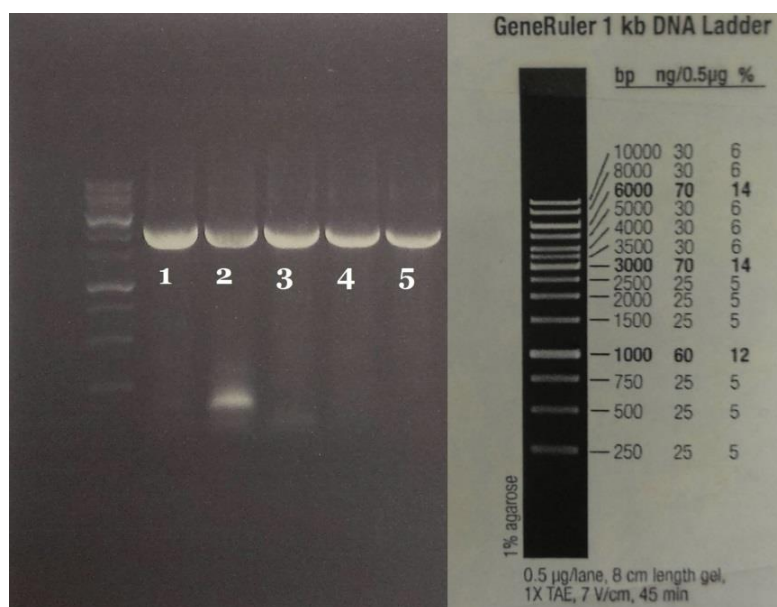
Pro vzájemné porovnání buněčných typů popsaných v kapitole 5.1 bylo vybráno deset genů, jejichž produkty byly fúzovány se zeleným fluorescenčním proteinem. Kmeny s fluorescenčně značenými produkty genů *ATO3*, *MET17*, *POX1*, *INO1* a *OLE1*, jejichž exprese a lokalizace byla studována u obřích kolonií v práci (Čáp et al., 2012a), byly poskytnuty ze sbírky laboratoře kvasinkových kolonií. Kmeny s *EGFP* značenými geny *CIT1*, *NCE102*, *ACS1*, *FBP1* a *RPL22A*, z nichž většina byla vybrána na základě porovnávání jejich exprese u tekutých stacionárních kultur v práci (Davidson et al., 2011), byly v rámci této práce nově zkonstruovány (pro podrobnější popis produktů výše zmíněných genů viz kapitolu 2.3.4).

Prvním krokem výroby byla příprava integračních kazet z plazmidu pYM27 metodou PCR (složení reakce, sekvence primerů a PCR program jsou podrobně rozepsány v kapitole 3.2.4.1). U produktů amplifikační reakce byla pomocí horizontální elektroforézy ověřena jejich délka (obrázek 5.4). Očekávaná velikost kazet byla ~2 500 bp. Ověřené kazety byly metodou LiAc/ssDNA/PEG transformace dopraveny do buněk, kde došlo k jejich včlenění do genomu pomocí homologní rekombinace (kapitola 3.2.4). Integrovaní genové kazety pomocí homologní rekombinace je na rozdíl od transformace autonomně se replikujícím plazmidem stabilní. Expresa fluorescenčního proteinu je regulována přirozeným promotorem značeného

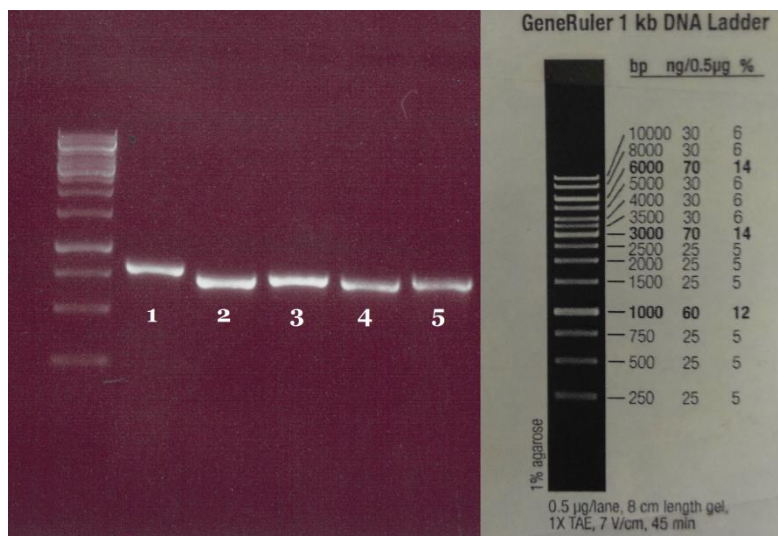
genu a neliší se tedy od exprese neoznačeného genu. Transformované buňky byly selektovány na pevném agarovém médiu obsahujícím antibiotikum Geneticin (G418 Sulfate). Od každého nově vytvořeného kmene bylo uskladněno několik klonů.

Správnost začlenění kazet do genomu nově zkonstruovaných kmenů byla poté ověřována v několika krocích. Nejprve byla porovnána morfologie obřích kolonií s mateřským kmenem (obrázek 5.6). U buněk klonů, jejichž obří kolonie se nelišily od kmene mateřského, bylo pod fluorescenčním mikroskopem pozorováno, zdali dochází k produkci fúzních proteinů (obrázek 5.7). Od každého kmene byl vybrán jeden klon, který byl dále ověřen pomocí PCR (obrázek 5.5). PCR reakce byla navržena tak, aby došlo k ověření spojení genu s fluorescenční značkou. Velikost PCR produktu se u jednotlivých kmenů liší a je uvedena v tabulce 5.1. Spojení obou genů bylo na závěr ověřeno pomocí sekvenace. Získaná sekvence byla porovnána se sekvencí očekávanou (více přílohy 9.3).

U všech zkonstruovaných kmenů se podařilo ověřit integraci genové kazety do genomu. Fúzní značení jednotlivých genů nemělo vliv na morfolonii kolonií a alkalizaci média. Kmen BY4742:*RPL22A-EGFP*, který byl morfologicky shodný s rodičovským kmenem, vytvářel ve srovnání s mateřským kmenem kolonie menší velikosti. Ačkoliv vykazoval zpomalený růst, byl použit k dalším experimentům.



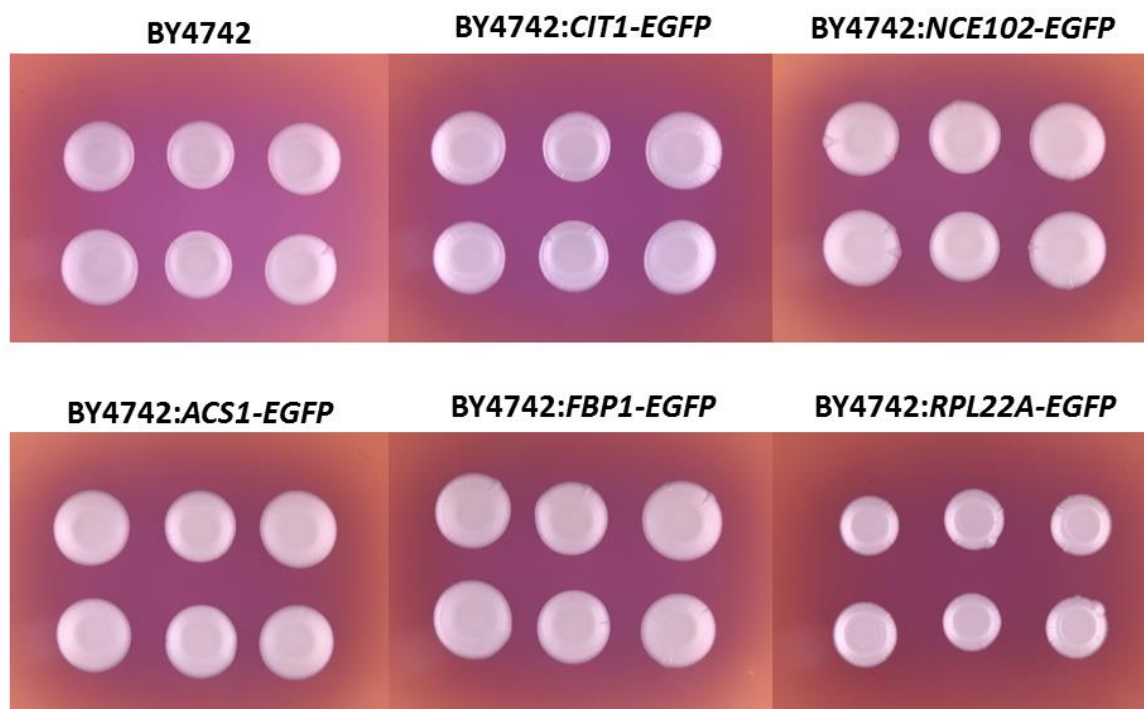
Obrázek 5.4: Snímek ověřovací elektroforézy integračních kazet. Vzorky číslo 1-5 jsou transformační kazety připravené pro C-koncovou fúzi genů *CIT1* (vzorek 1), *NCE102* (vzorek 2), *ACS1* (vzorek 3), *FBP1* (vzorek 4) a *RPL22A* (vzorek 5).



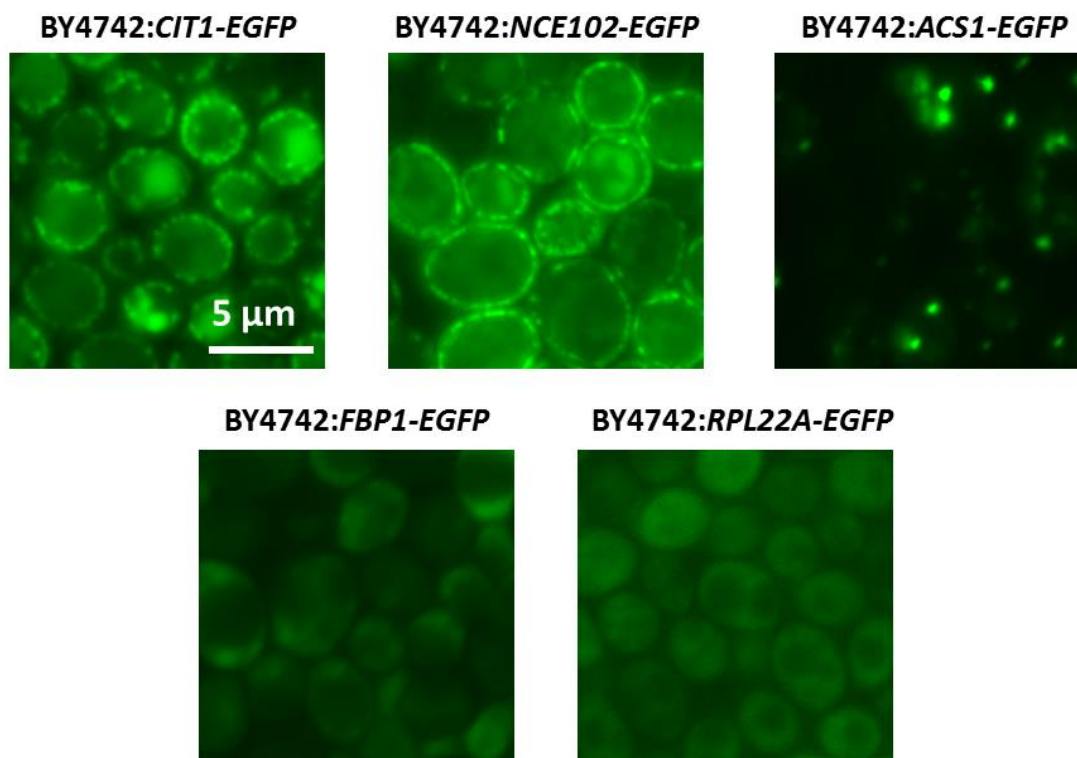
Obrazek 5.5: Snímek elektroforetické analýzy produktů ověřovací PCR. Jednotlivé vzorky jsou fúzní přechody genů s *EGFP* v následujícím *CIT1*, *NCE102*, *ACS1*, *FBP1* a *RPL22A*. Zobrazené produkty byly pro hlubší ověření osekvenovány.

ověřovaný gen	velikost fragmentu
<i>CIT1</i>	848 bp
<i>NCE102</i>	768 bp
<i>ACS1</i>	774 bp
<i>FBP1</i>	759 bp
<i>RPL22A</i>	792 bp

Tabulka 5.1: Velikost jednotlivých fragmentů ověřovací PCR, jejichž sekvence byla osekvenována.



Obrázek 5.6: Porovnání morfologie nově zkonstruovaných kmenů s kmenem rodičovským. Staří obřích kolonií je 14 dní. Kolonie se nachází v druhé alkalické fázi růstu a médium je obarveno na fialovo v důsledku přítomnosti pH indikátoru bromkresolového purpuru.



Obrázek 5.7: Snímky ověření produkce fúzních proteinů. Zobrazené buňky byly po třech dnech odebrány z kolonií rostoucích na pevném YEPG médiu. Doba expozice všech snímku je 700 ms.

5.4 Exprese a lokalizace fúzních GFP proteinů v závislosti na podmínkách kultivace

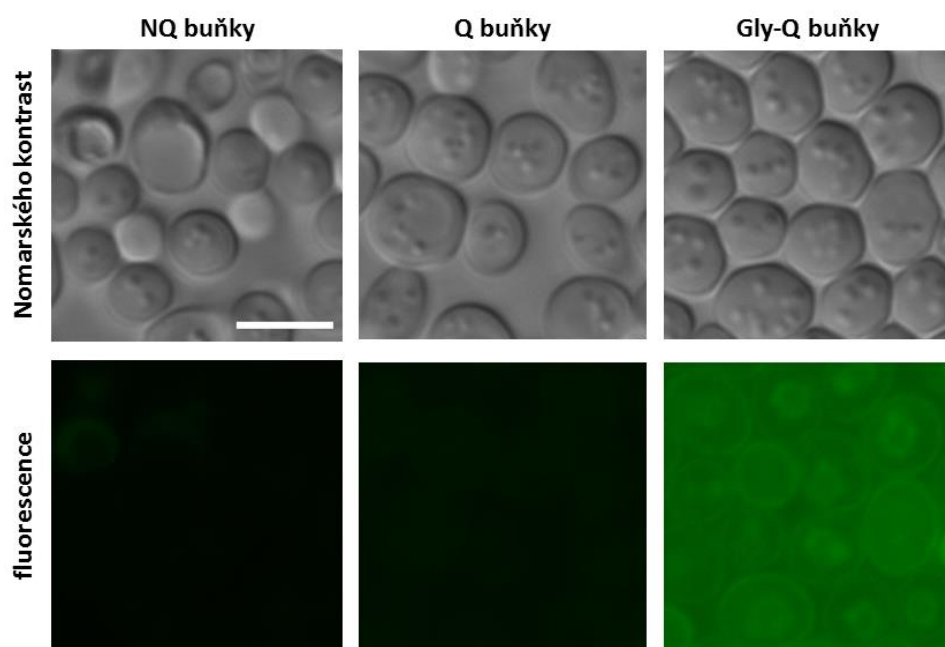
Všech deset vybraných GFP kmenů bylo kultivováno na čtyřech typech médií. Z tekutého fermentačního a tekutého respiračního média byla populace buněk rozdělena na hustotním sacharózovém gradientu po sedmi dnech od zaočkování. Poté byly izolované buněčné typy snímány na epifluorescenčním mikroskopu při zvětšení 1000x a byla měřena intenzita jejich fluorescence pomocí spektrofotometru.

Z kvasinkových kolonií rostoucích na fermentačním a respiračním agarovém médiu byly po sedmi a čtrnácti dnech vytvořeny ultratenké 20 μm řezy z jejich centrálních částí. Řezy byly pozorovány při zvětšení 200x pod epifluorescenčním mikroskopem pro vizualizaci rozložení fluorescence. Dále byly pořízeny snímky jednotlivých typů buněk vytvářejících se v průběhu vývoje kolonie při zvětšení 1000x. Čtrnáct dní staré kolonie byly stejně jako tekuté kultury rozděleny na sacharózovém gradientu a byla změřena intenzita jejich fluorescence na spektrofotometru. V následujících kapitolách budou probrány výsledky pro jednotlivé fluorescenční proteiny.

5.4.1 BY4742:ATO3-EGFP

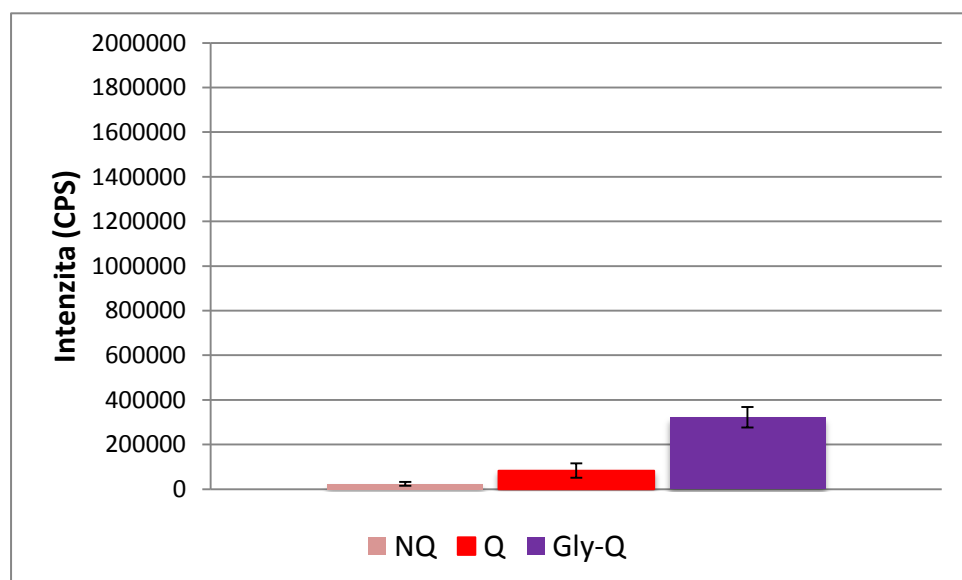
Amoniakový transportér Ato3p lokalizovaný na plazmatické membráně je proteinem typickým pro U buňky (Čáp et al., 2012a). Jeho exprese v U buňkách je patrná již počátkem diferenciací kolonie během sedmého dne růstu. U kolonií rostoucích na glukózovém pevném médiu je exprese Ato3p rovněž výrazná u horní vrstvy buněk, ale dochází k ní až po sedmém dni růstu kolonie (obrázek 5.9). Měření intenzity fluorescence ukázalo, že u L a YPD-L buněk k expresi tohoto proteinu takřka nedochází (graf 5.2).

V rámci tekutých kultur dochází k výraznější expresi pouze u Gly-Q buněk. Exprese zaznamenaná u kultur rostoucích v glukózovém médiu je v případě NQ buněk takřka nulová a v případě Q buněk velmi nízká (obrázek 5.8) (graf 5.1).

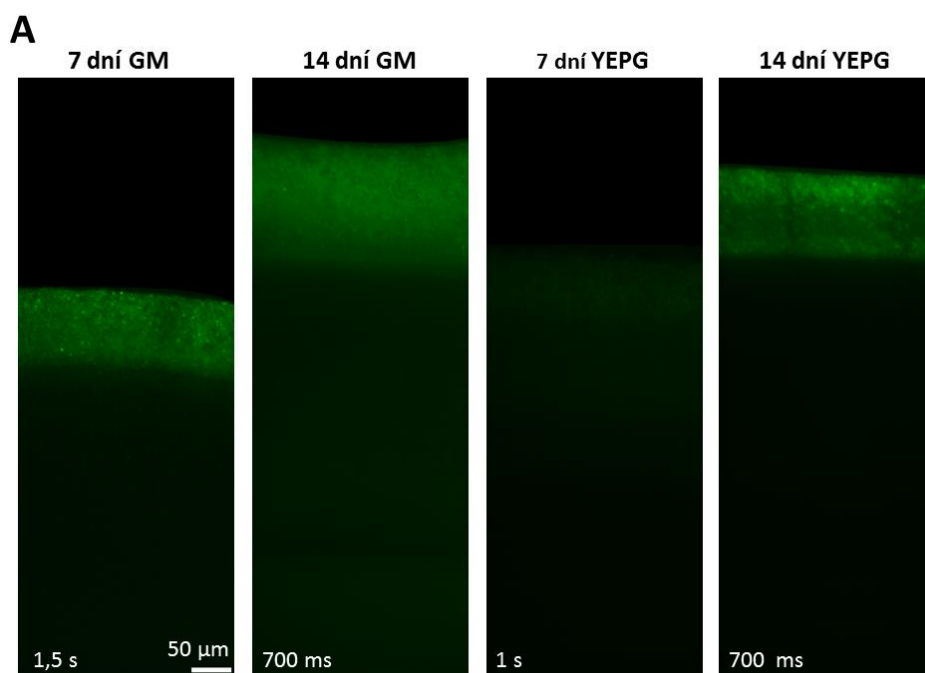


Obrázek 5.8:

Snímky buněčných typů izolovaných ze 7 dní starých tekutých kultur. Zobrazené měřítko odpovídá 5 µm. Doba expozice všech snímků byla 500 ms.

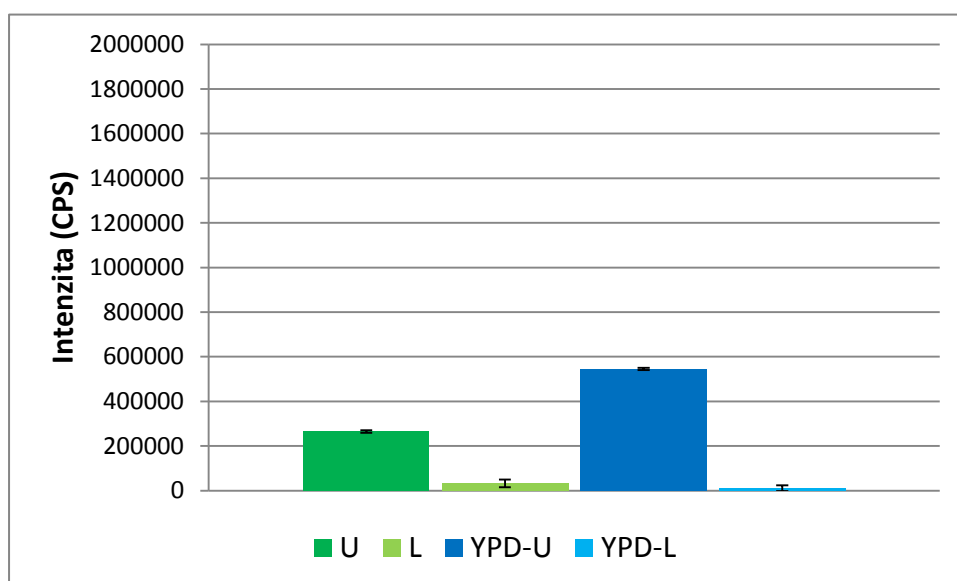
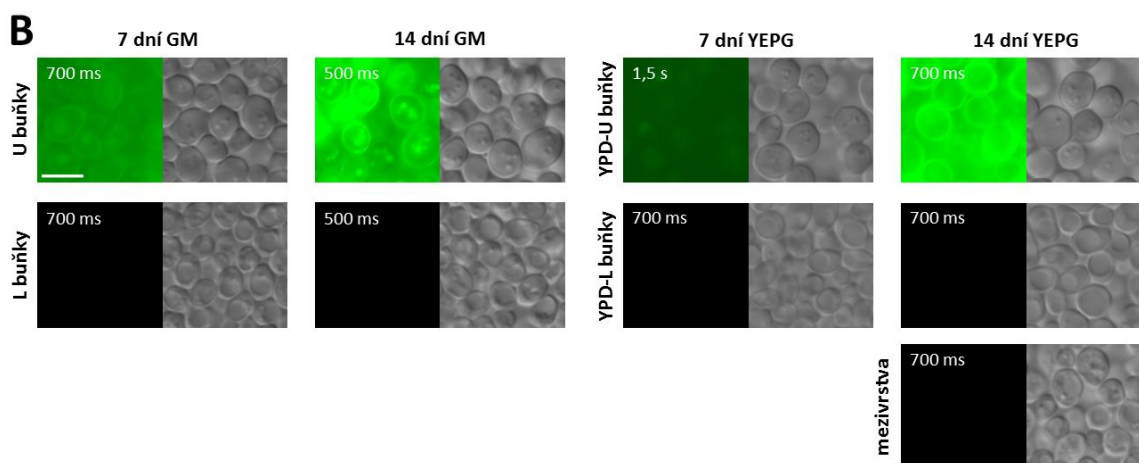


Graf 5.1: Intenzita fluorescence proteinu Ato3p u buněčných typů izolovaných z tekutých kultur. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.



Obrázek 5.9:

(A) Vertikální řezy kolonií produkujících fluorescenčně značený protein Ato3p. (B) Snímky jednotlivých buněčných typů starých 7 a 14 dní. Bílá šipka ukazuje na GFP dopravené do vakuoly autofagií. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μ m.



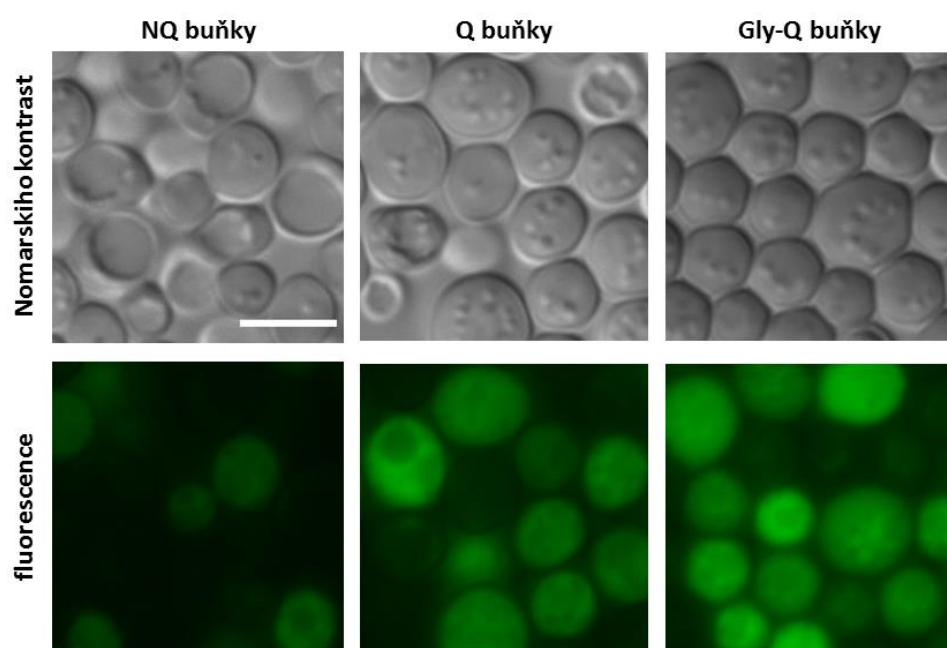
Graf 5.2: Intenzita

fluorescence proteinu Ato3p u buněčných typů izolovaných ze 14 dní starých kolonií. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.

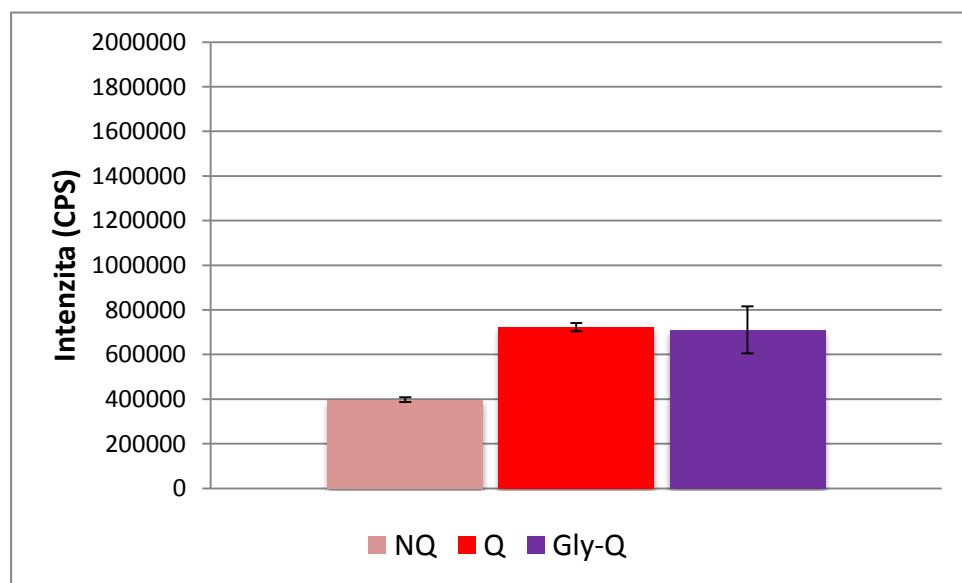
5.4.2 BY4742:*INO1-EGFP*

Inositol-3-fosfát syntáza Ino1p je proteinem typickým pro L buňky (Čáp et al., 2012a). U kolonií rostoucích na glukózovém médiu je jeho exprese výrazná především u YPD-Q buněk (graf 5.4). Nejsilnější signál je ovšem patrný na vertikálním řezu 14 dní staré kolonie v oblasti mezivrstvy (obrázek 5.11).

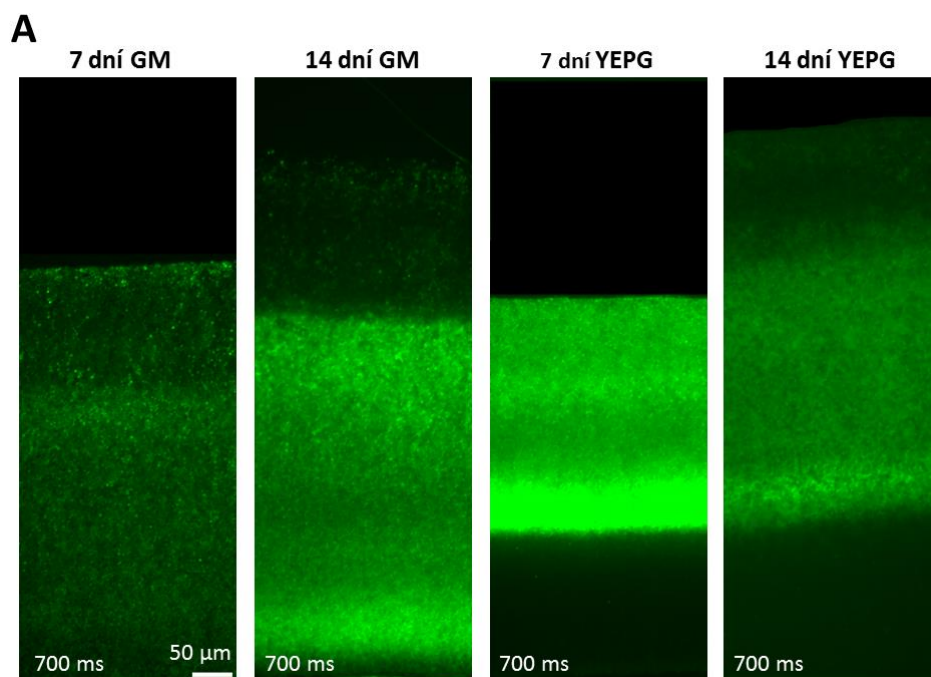
U tekutých kultur je protein Ino1p vysoce exprimován především v Q a Gly-Q buňkách (obrázek 5.10). Úroveň exprese proteinu v NQ buňkách je srovnatelná s jeho expresí v U buňkách (graf 5.3).



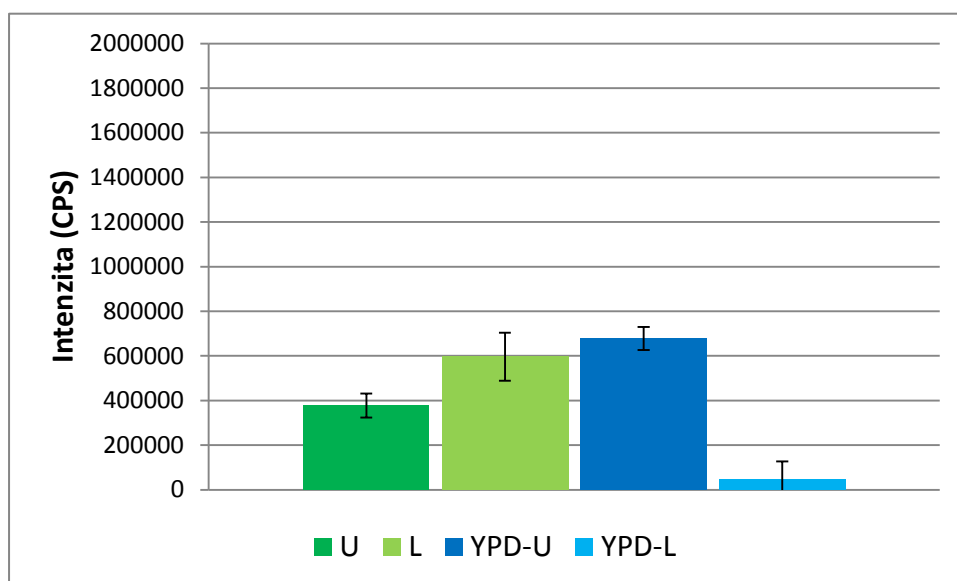
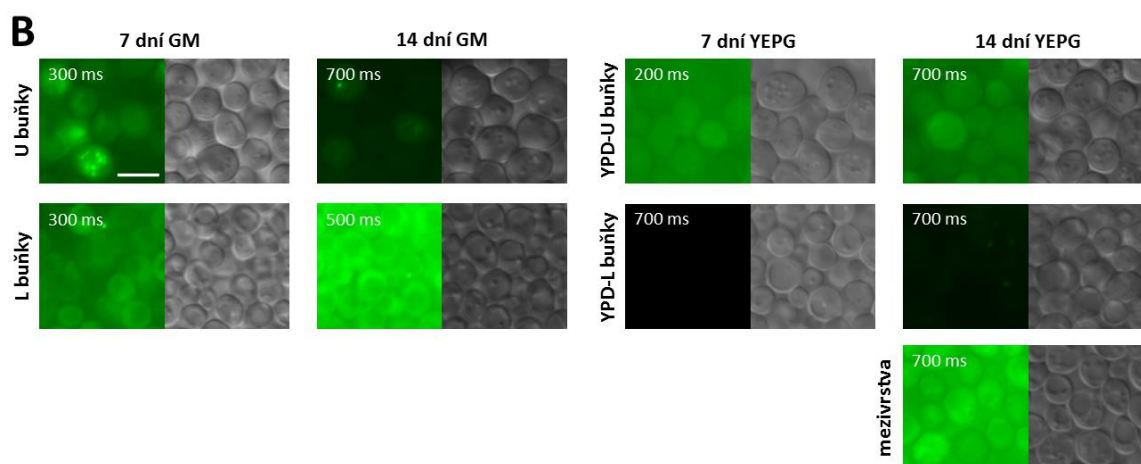
Obrázek 5.10: Snímky buněčných typů izolovaných ze 7 dní starých tekutých kultur. Zobrazené měřítko odpovídá 5 µm. Doba expozice všech snímků byla 700 ms.



Graf 5.3: Intenzita fluorescence proteinu Ino1p u buněčných typů izolovaných z tekutých kultur. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.



Obrázek 5.11:
 (A) Vertikální řezy kolonií produkujících fluorescenčně značený protein Ino1p. (B) Snímky jednotlivých buněčných typů starých 7 a 14 dní. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μm.

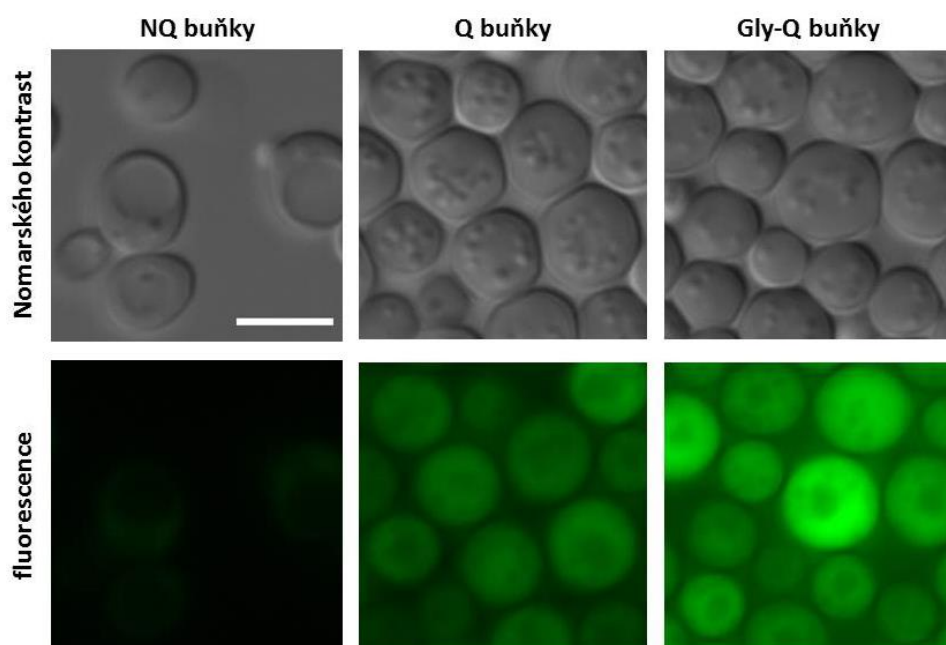


Graf 5.4: Intenzita fluorescence proteinu Ino1p u buněčných typů izolovaných ze 14 dní starých kolonií. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.

5.4.3 BY4742:MET17-EGFP

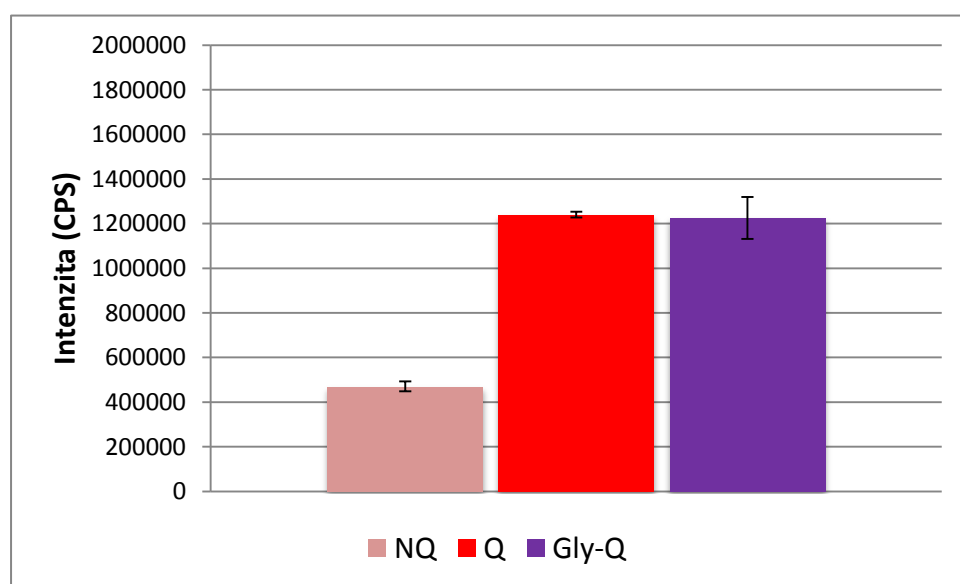
Met17p je považován na základě práce (Čáp et al., 2012a) za protein typický pro L buňky. V rámci této práce byl použit zcela totožný kmen, ovšem u kolonií rostoucích na glycerolovém médiu byla exprese proteinu vyšší u U buněk (obrázek 5.13). U buněk izolovaných z kolonií rostoucích na glukózovém médiu byla exprese (obdobně jako u U a L buněk) vyšší v horní vrstvě tvořené YPD-Q buňkami (graf 5.6).

U tekutých kultur byla vysoká úroveň exprese proteinu zaznamenána u Q a Gly-Q buněk (obrázek 5.12) (graf 5.5).

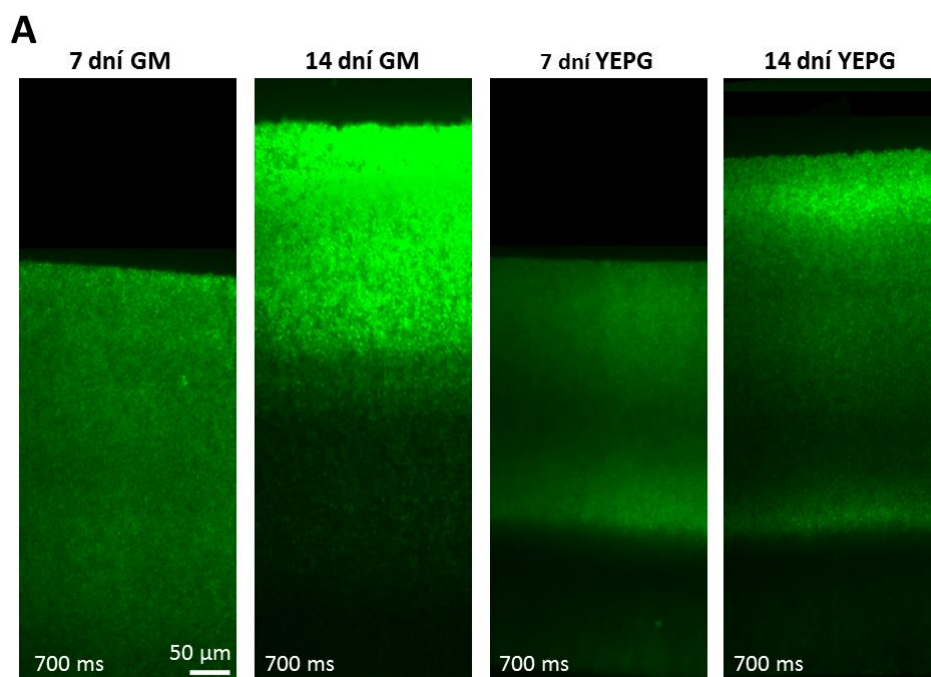


Obrázek 5.12:

Snímky buněčných typů izolovaných ze 7 dní starých tekutých kultur. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μ m. Doba expozice všech snímků byla 700 ms.

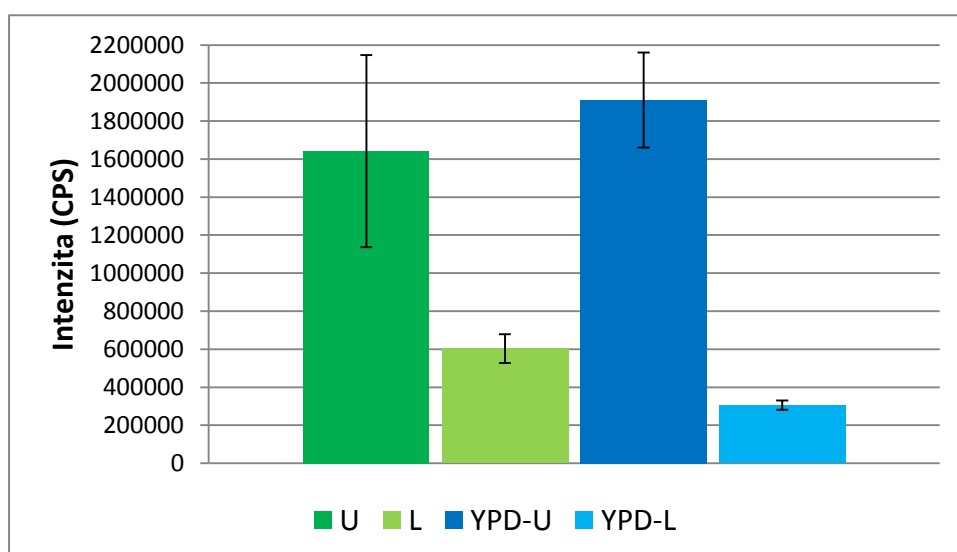
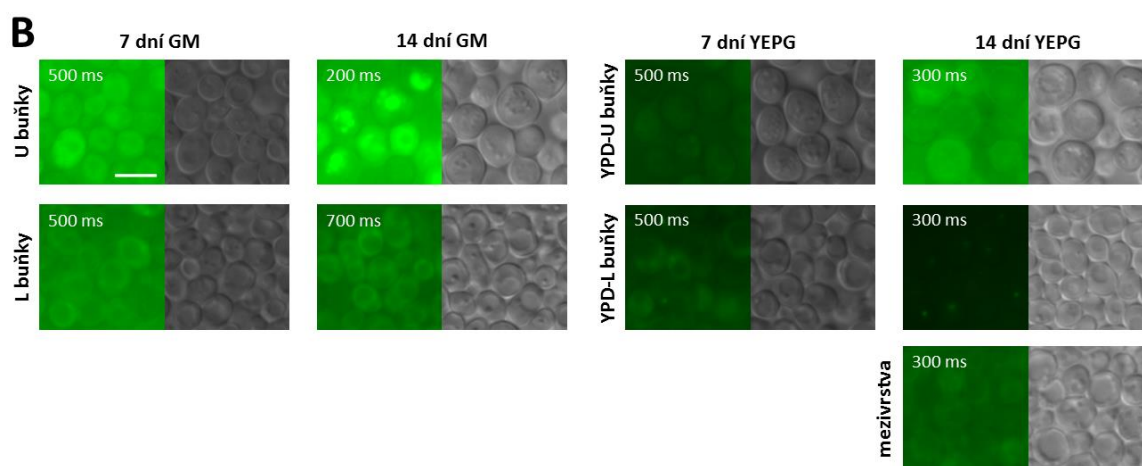


Graf 5.5: Intenzita fluorescence proteinu Met17p u buněčných typů izolovaných z tekutých kultur. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.



Obrázek 5.13: (A)

Vertikální řezy kolonií produkujících fluorescenčně značený protein Met17p. (B) Snímky jednotlivých buněčných typů starých 7 a 14 dní. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μm.



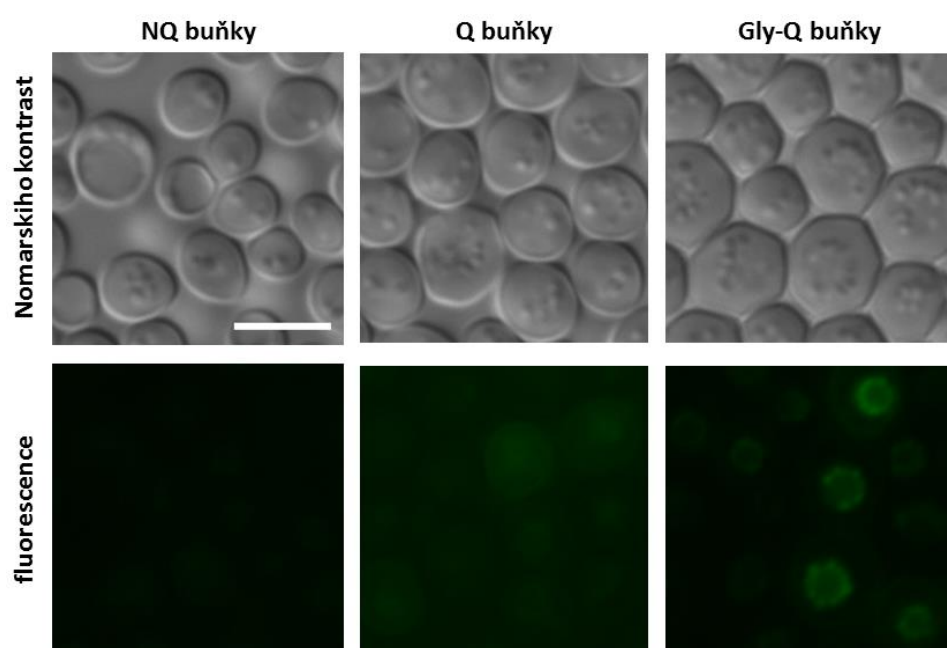
Graf 5.6: Intenzita

fluorescence proteinu Met17p u buněčných typů izolovaných ze 14 dní starých kolonií. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.

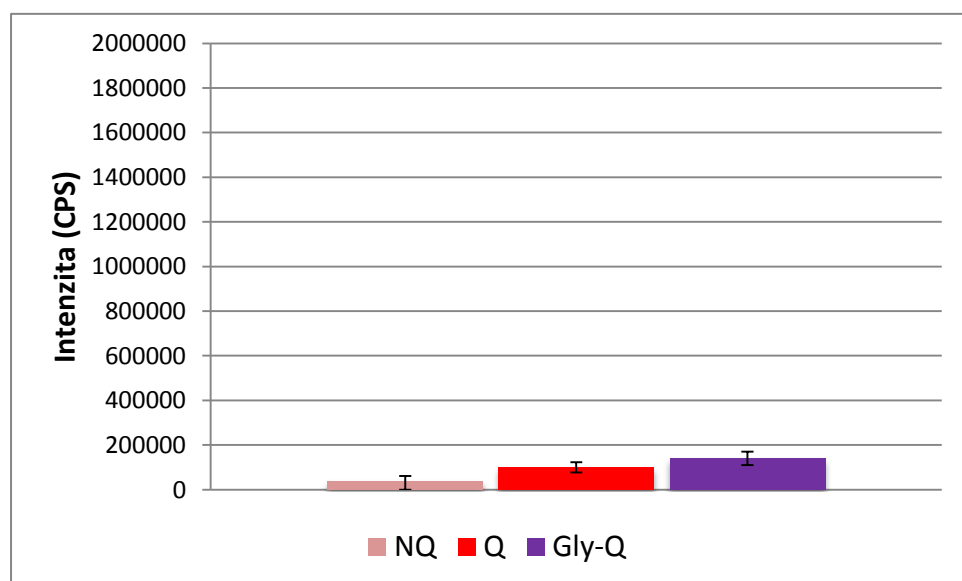
5.4.4 BY4742:OLE1-EGFP

Ole1p je typickým proteinem L buněk (Čáp et al., 2012a). Expresi tohoto proteinu byla všeobecně velmi slabá (graf 5.7 a 5.8). V rámci kolonií byla jeho exprese nejvyšší u L buněk. Na vertikálním řezu kolonií rostoucí na glukozovém médiu byl nejsilnější signál fluorescence patrný v oblasti mezivrstvy (obrázek 5.15).

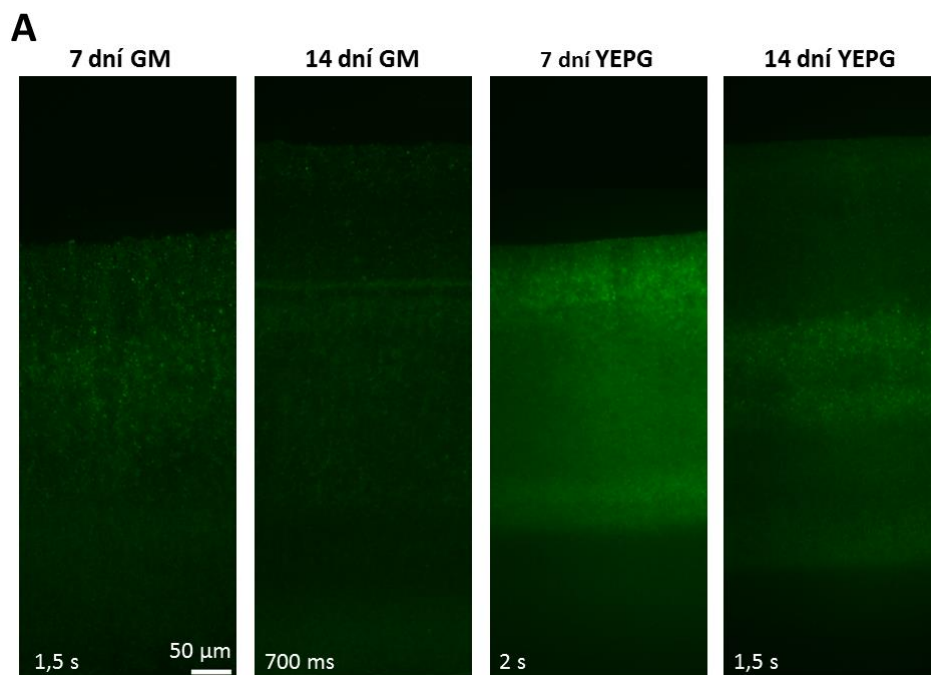
U NQ buněk byla exprese proteinu mizivá. K expresi Ole1p v rámci tekutých kultur dochází především v Q a Gly-Q buňkách (obrázek 5.14).



Obrázek 5.14: Snímky buněčných typů izolovaných ze 7 dní starých tekutých kultur. Zobrazené měřítko odpovídá 5 µm. Doba expozice všech snímků byla 700 ms.

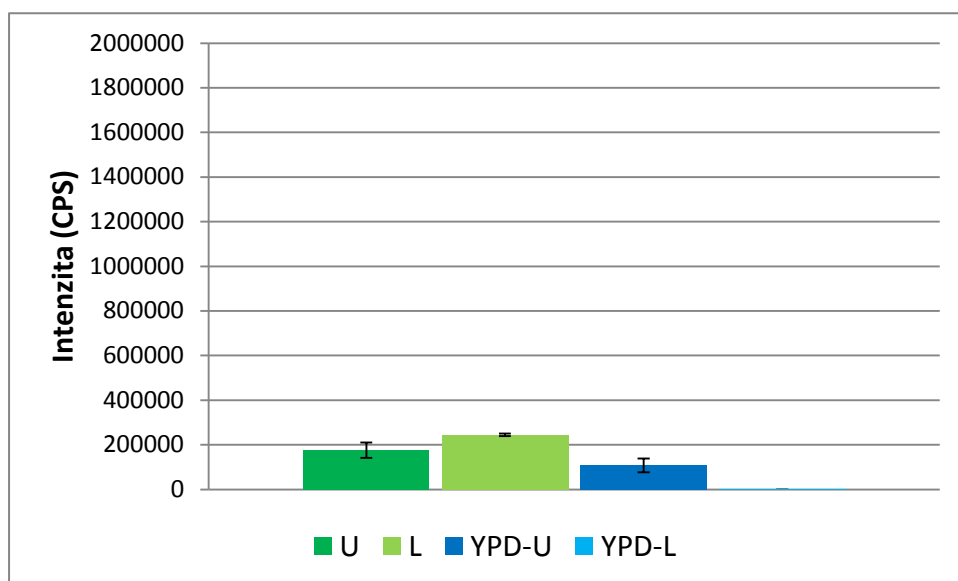
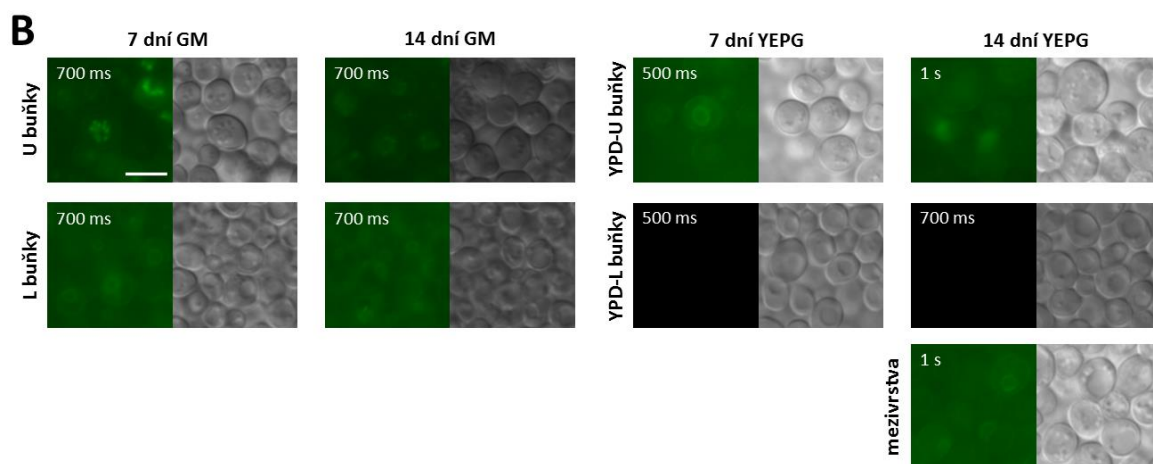


Graf 5.7: Intenzita fluorescence proteinu Ole1p u buněčných typů izolovaných z tekutých kultur. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.



Obrázek 5.15:

(A) Vertikální řezy kolonií produkujících fluorescenčně značený protein Ole1p. (B) Snímky jednotlivých buněčných typů starých 7 a 14 dní. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μ m.



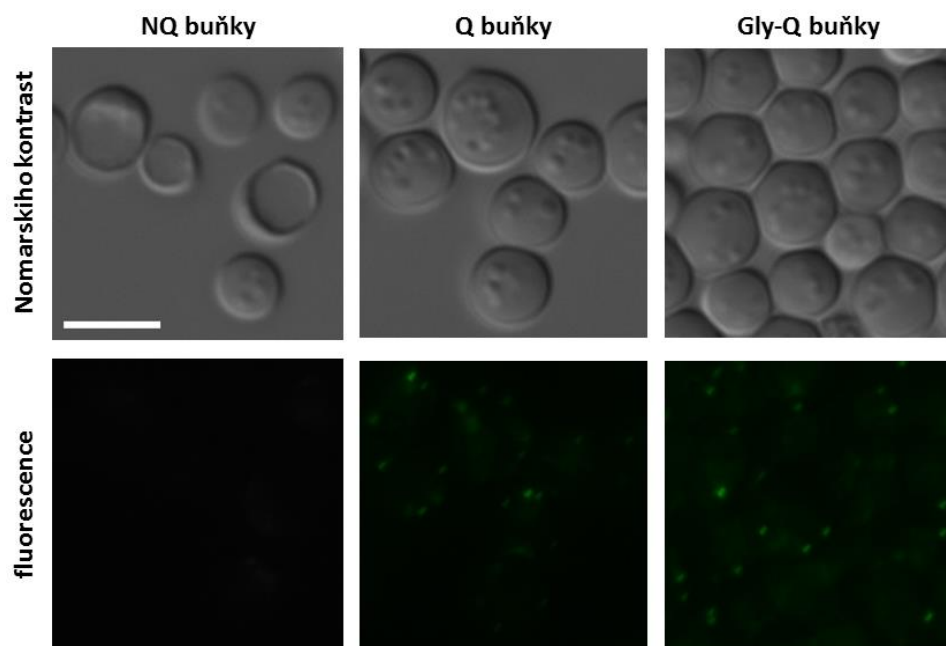
Graf 5.8: Intenzita

fluorescence proteinu Ole1p u buněčných typů izolovaných ze 14 dní starých kolonií. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.

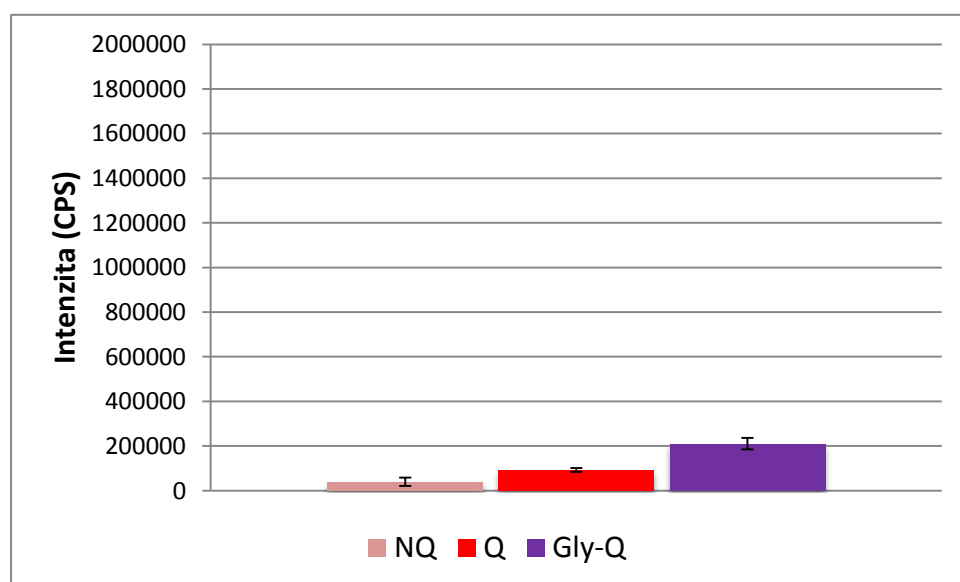
5.4.5 BY4742:POX1-EGFP

Acyl-koenzym A oxidasa Pox1p je proteinem typickým pro U buňky (Čáp et al., 2012a). U kolonií rostoucích na glukózovém médiu je exprese proteinu vysoká v horní vrstvě buněk. U YPD-L buněk k expresi Pox1p prakticky nedochází (graf 5.10) (obrázek 5.17).

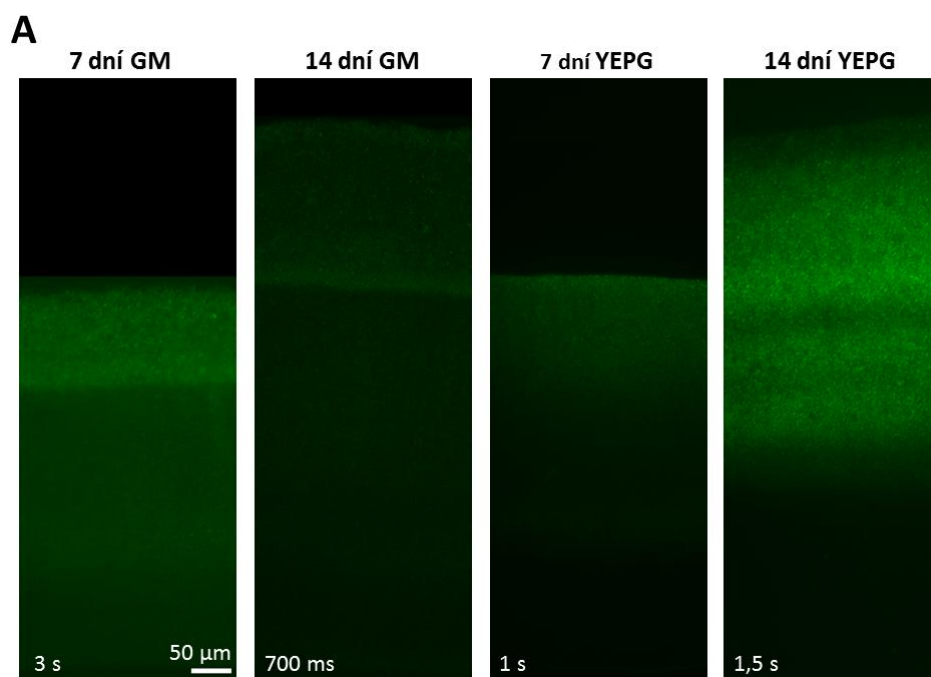
U tekutých kultur je exprese proteinu velmi nízká, nejvyšší hodnota byla zaznamenána u Gly-Q buněk (graf 5.9) (obrázek 5.16).



Obrázek 5.16: Snímky buněčných typů izolovaných ze 7 dní starých tekutých kultur. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μm . Doba expozice všech snímků byla 700 ms.

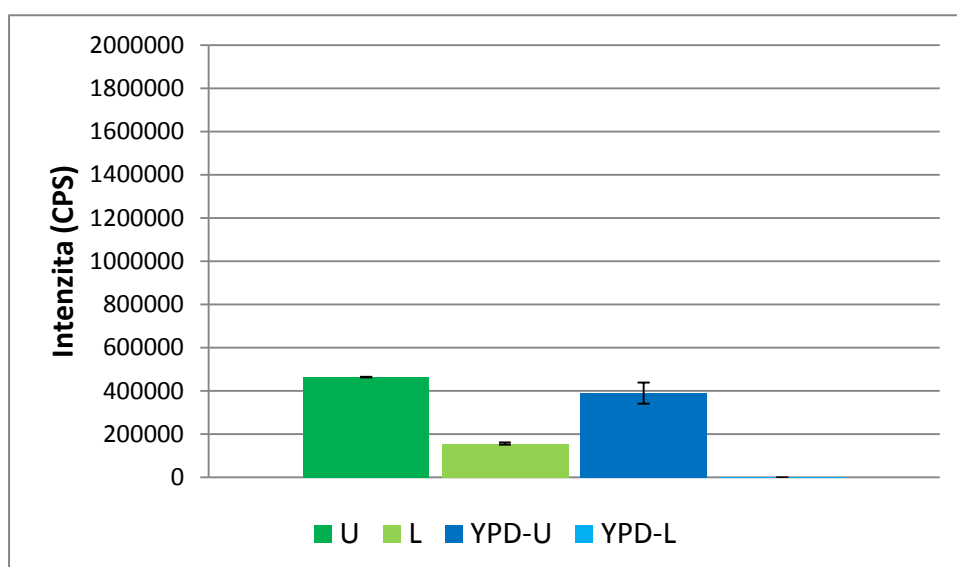
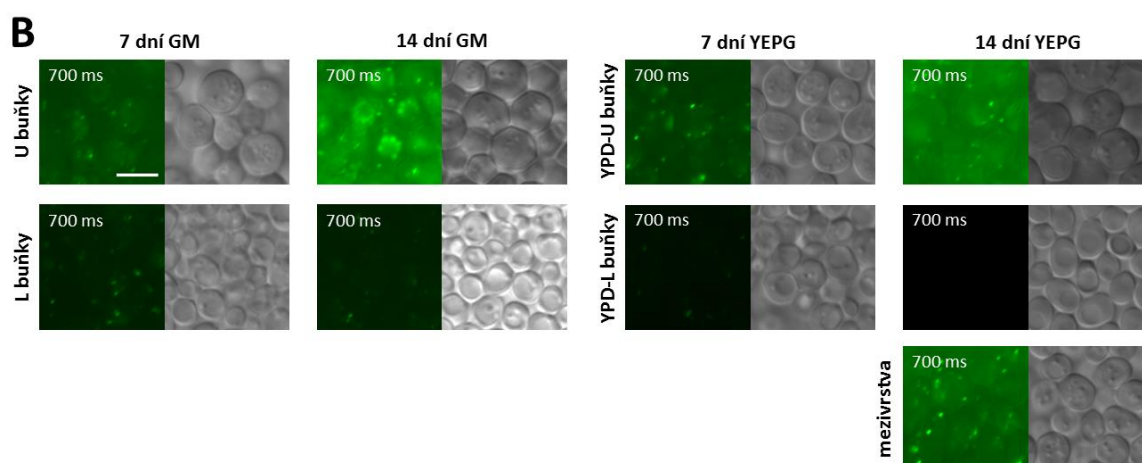


Graf 5.9: Intenzita fluorescence proteinu Pox1p u buněčných typů izolovaných z tekutých kultur. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.



Obrázek 5.17:

(A) Vertikální řezy kolonií produkujících fluorescenčně značený protein Pox1p. (B) Snímky jednotlivých buněčných typů starých 7 a 14 dní. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μ m.

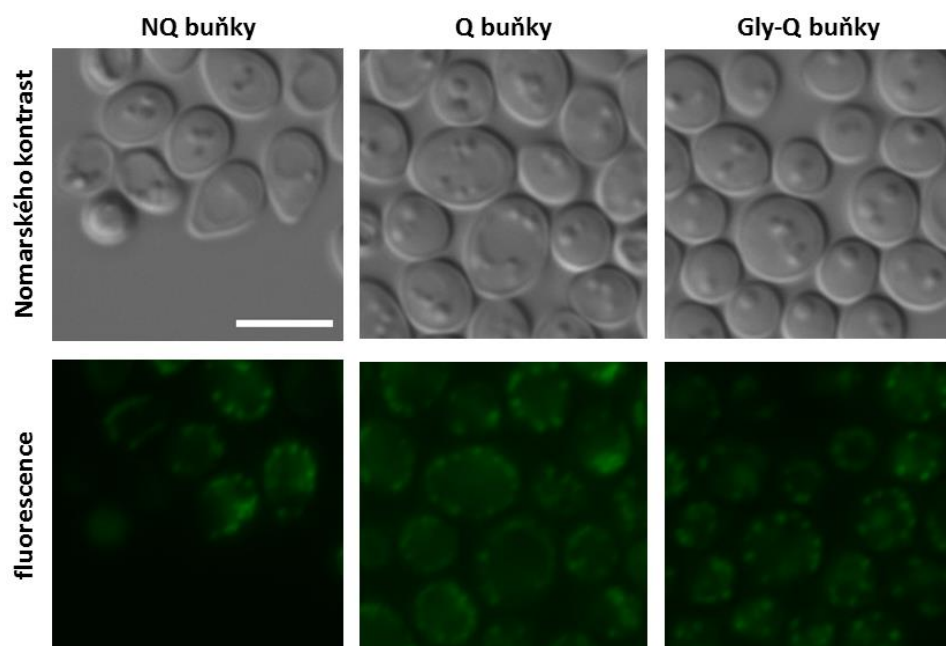


Graf 5.10:

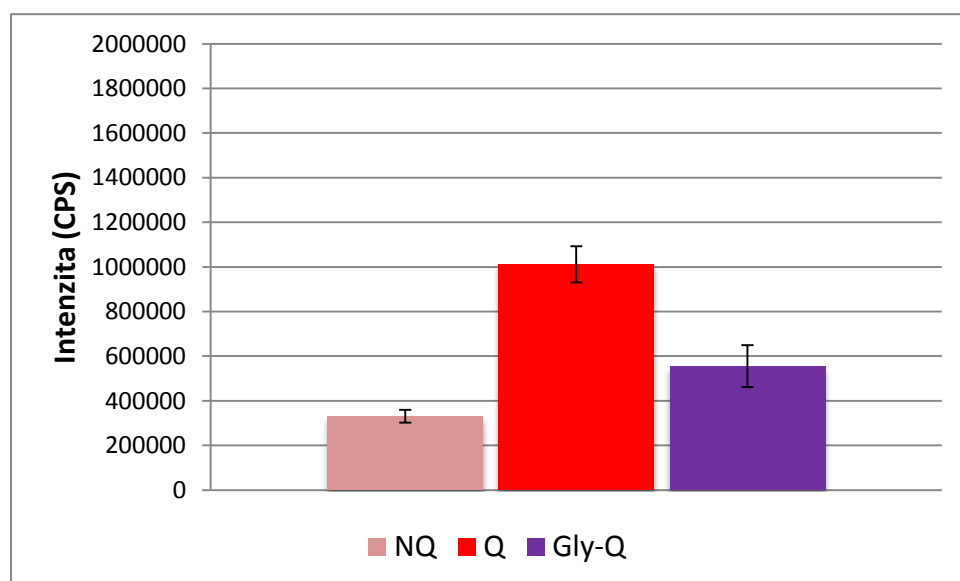
Intenzita fluorescence proteinu Pox1p u buněčných typů izolovaných ze 14 dní starých kolonií. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.

5.4.6 BY4742:*CIT1-EGFP*

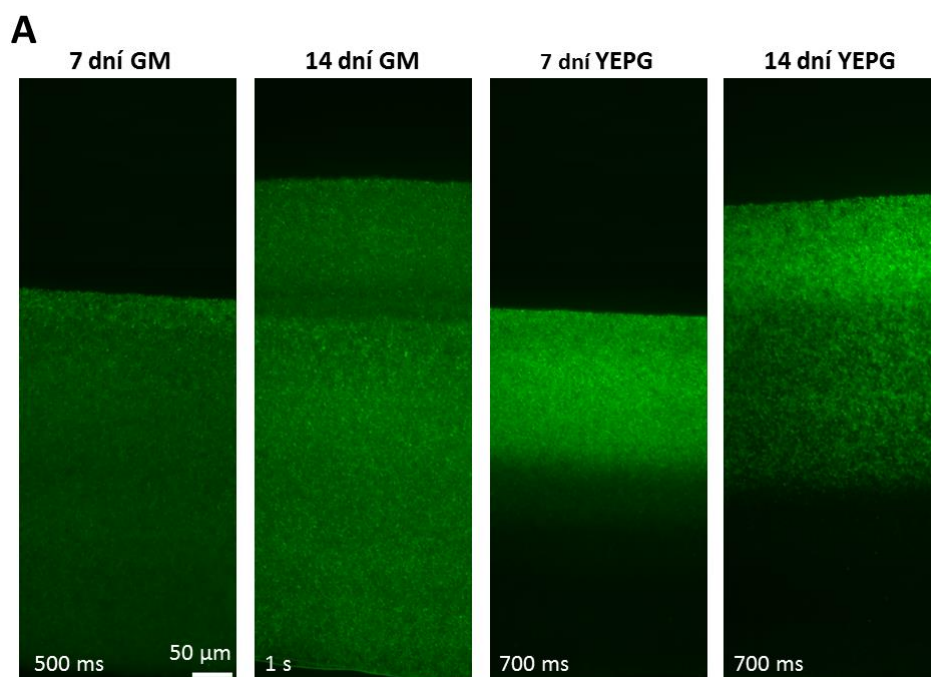
Citrát syntáza Cit1p je protein, jehož zvýšená exprese byla zaznamenána u Q buněk (Davidson et al., 2011) (graf 5.11) (obrázek 5.18). V rámci kolonií byla nejvyšší exprese proteinu zaznamenána u YPD-U buněk (graf 5.12). U kolonií rostoucích na glycerolovém médiu je po sedmi dnech růstu exprese Cit1p rovnoměrná ve všech vrstvách (obrázek 5.19). Na řezu 14 dní starou kolonií je však již patrný silnější signál u L buněk tvořících spodní část kolonie.



Obrázek 5.18: Snímky buněčných typů izolovaných ze 7 dní starých tekutých kultur. Zobrazené měřítko odpovídá 5 µm. Doba expozice všech snímků byla 700 ms.

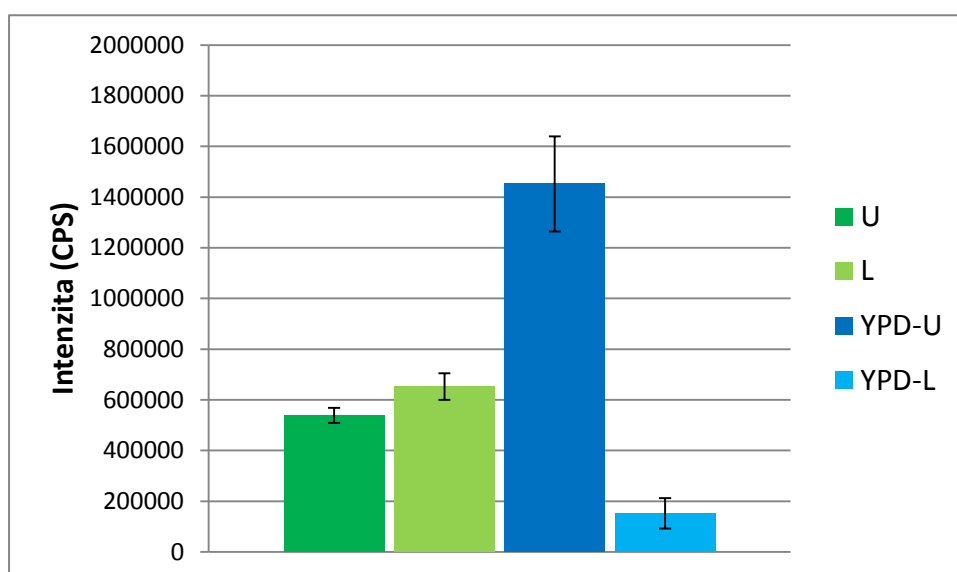
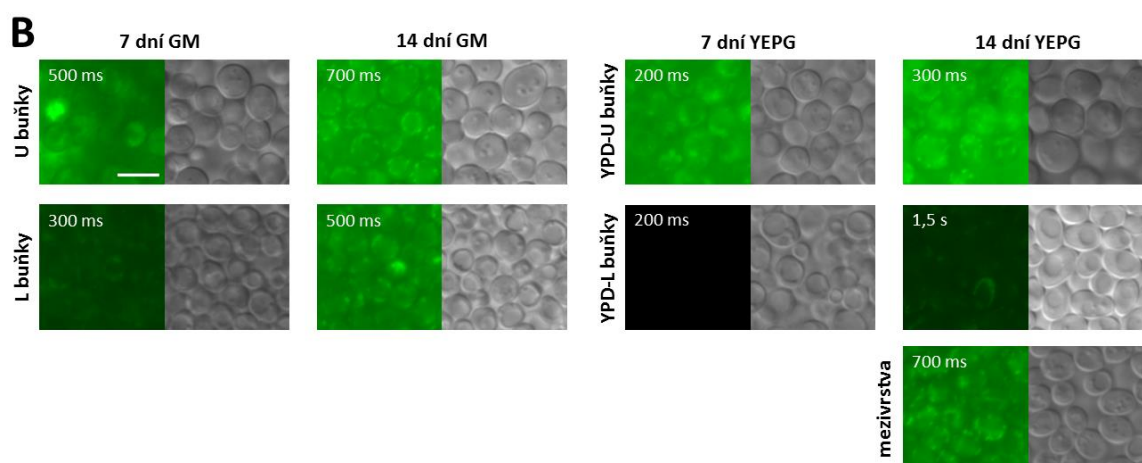


Graf 5.11: Intenzita fluorescence proteinu Cit1p u buněčných typů izolovaných z tekutých kultur. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.



Obrázek 5.19:

(A) Vertikální řezy kolonií produkujících fluorescenčně značený protein Cit1p. (B) Snímky jednotlivých buněčných typů starých 7 a 14 dní. Zobrazené měřítko odpovídá 5 µm.

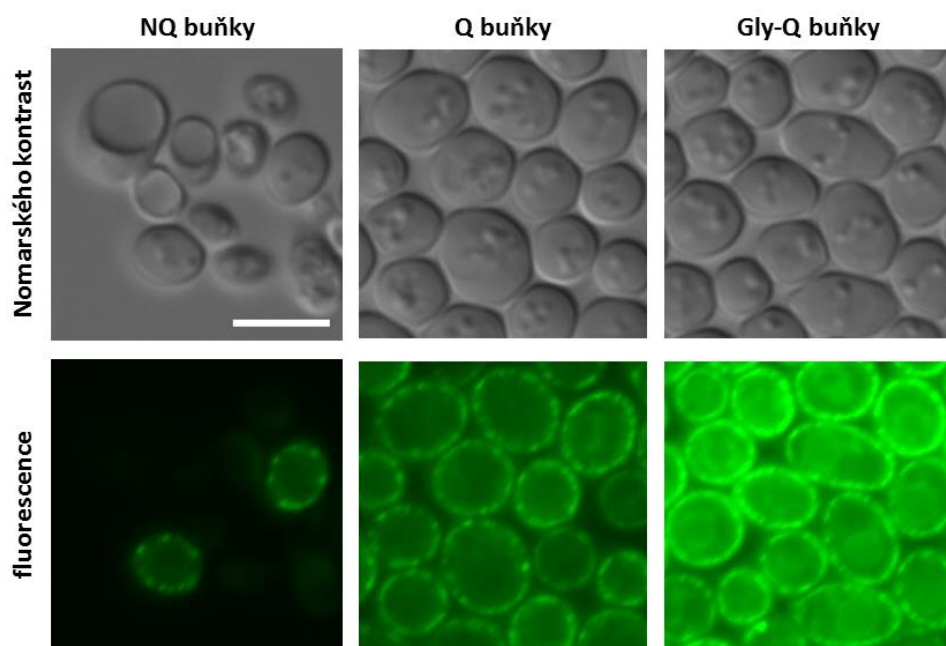


Graf 5.12: Intenzita

fluorescence proteinu Cit1p u buněčných typů izolovaných ze 14 dní starých kolonií. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.

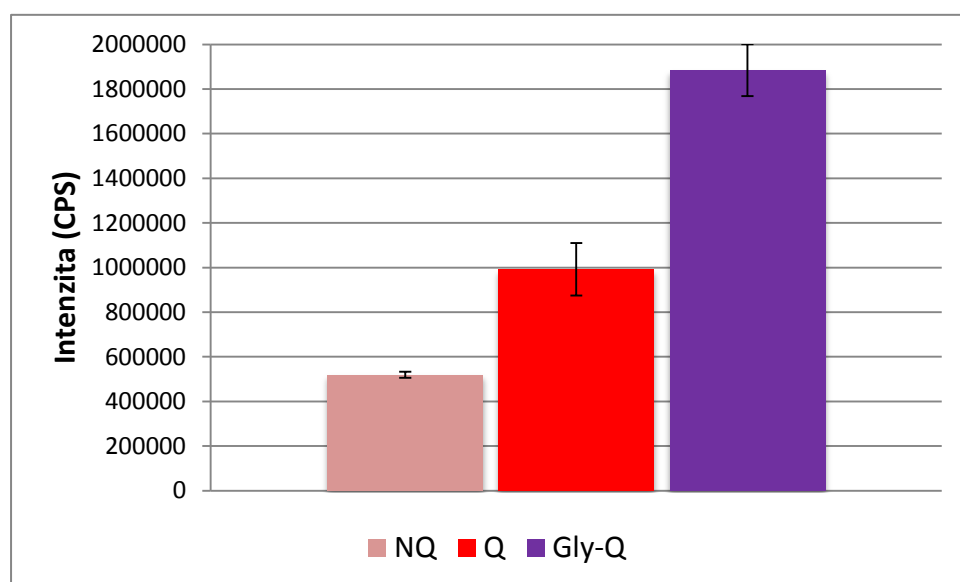
5.4.7 BY4742:*NCE102-EGFP*

Membránový protein Nce102p je považován za protein typický pro Q buňky (Davidson et al., 2011). Analýza všech typů buněk ukázala, že exprese tohoto proteinu je zvýšena především u odolných typů buněk, kterými jsou Gly-Q, U, YPD-U a výše zmíněné Q buňky (graf 5.13 a 5.14) (obrázek 5.20 a 5.21).



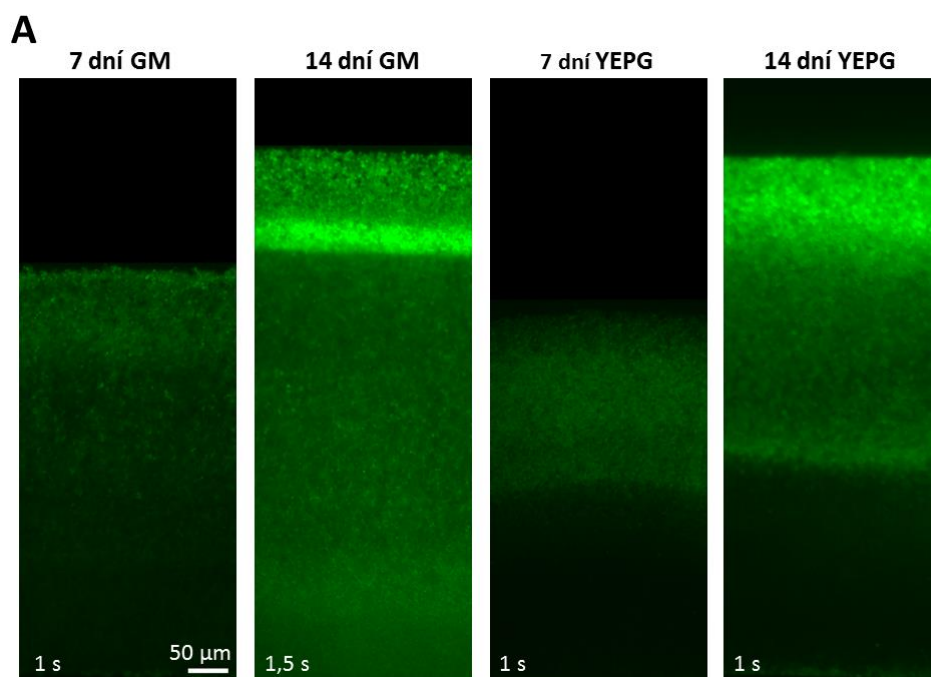
Obrázek 5.20:

Snímky buněčných typů izolovaných ze 7 dní starých tekutých kultur. Zobrazené měřítko odpovídá 5 µm. Doba expozice všech snímků byla 700 ms.



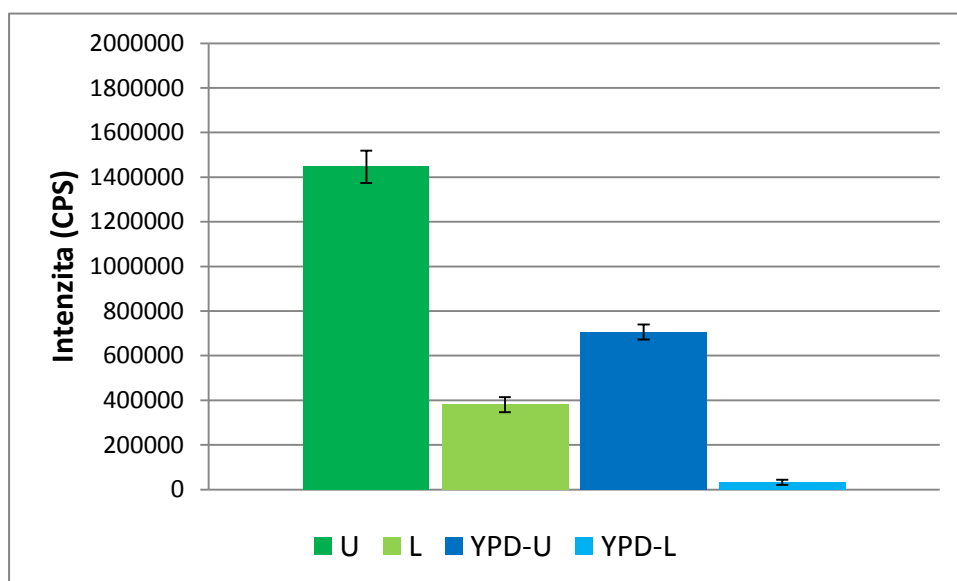
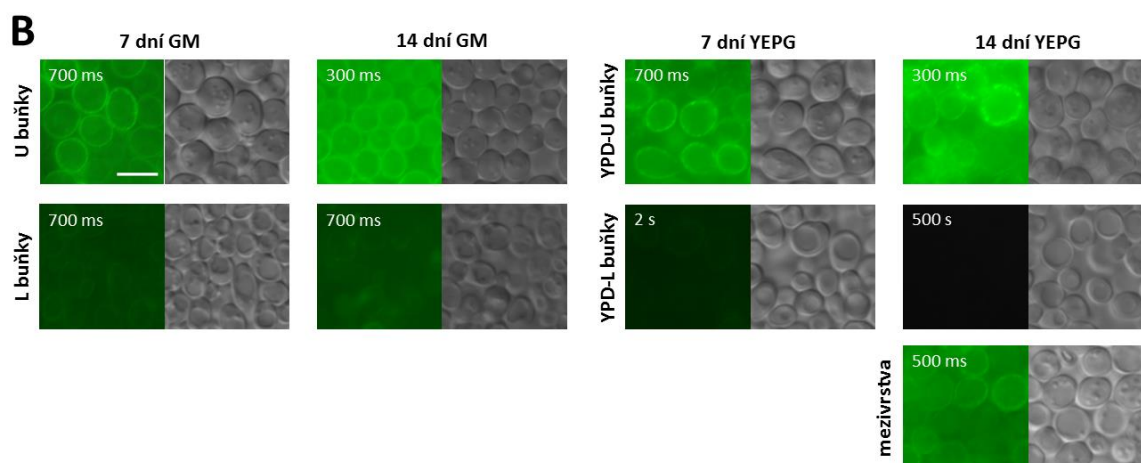
Graf 5.13: Intenzita

fluorescence proteinu Nce102p u buněčných typů izolovaných z tekutých kultur. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.



Obrázek 5.21:

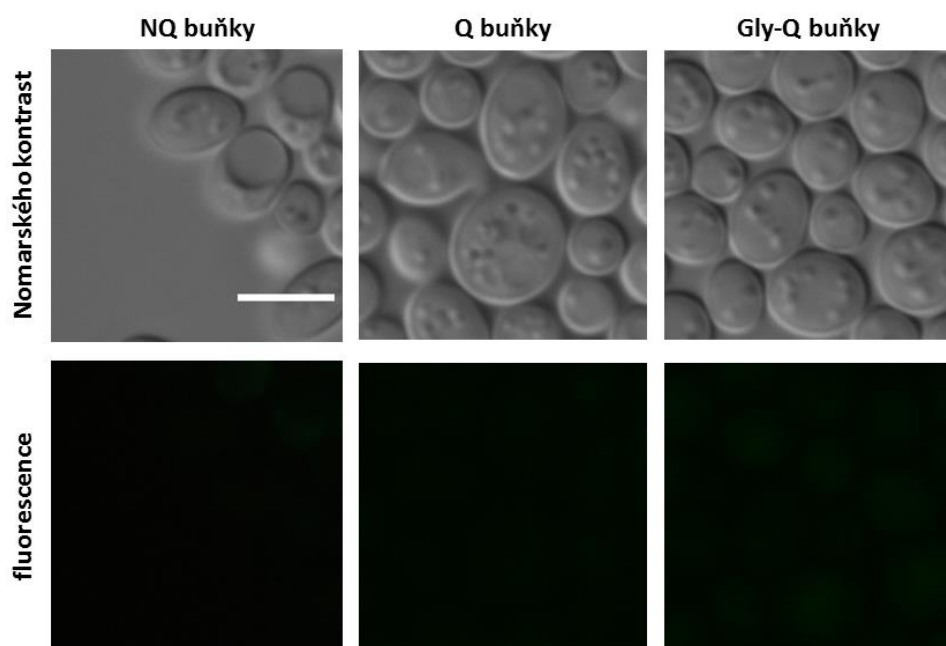
(A) Vertikální řezy kolonií produkujících fluorescenčně značený protein Nce102p. (B) Snímky jednotlivých buněčných typů starých 7 a 14 dní. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μm.



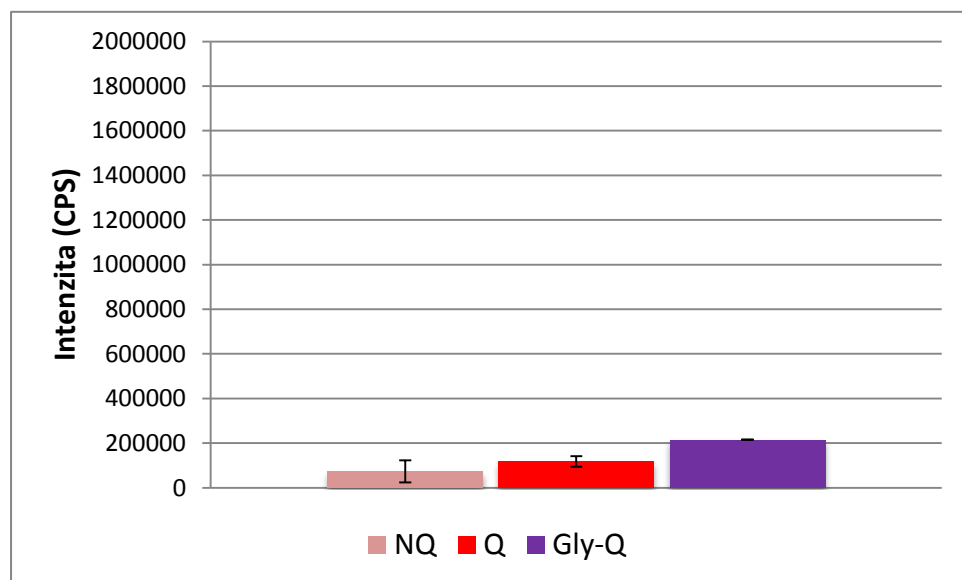
Graf 5.14: Intenzita fluorescence proteinu Nce102p u buněčných typů izolovaných ze 14 dní starých kolonií. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.

5.4.8 BY4742:*FBP1-EGFP*

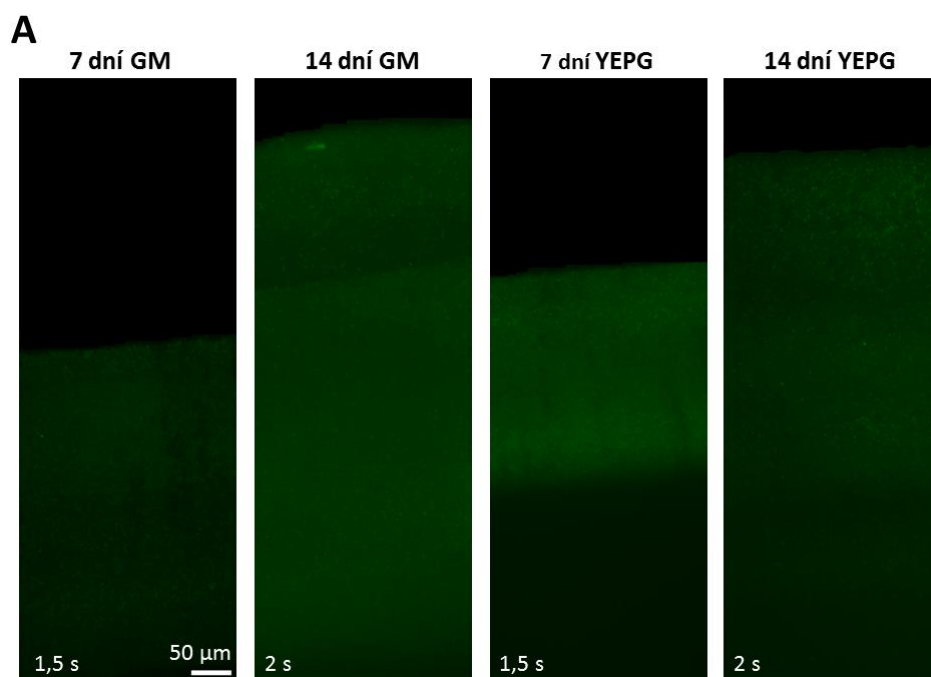
Klíčový enzym glukoneogeneze Fbp1p má ve všech typech izolovaných buněk relativně nízkou úroveň exprese (obrázek 5.22 a 5.23). Nejvyšší hodnota fluorescence byla naměřena u Gly-Q buněk (graf 5.15) naopak u YPD-L se intenzita fluorescence blížila nule (graf 5.16).



Obrázek 5.22: Snímky buněčných typů izolovaných ze 7 dní starých tekutých kultur. Zobrazené měřítko odpovídá 5 µm. Doba expozice všech snímků byla 700 ms.

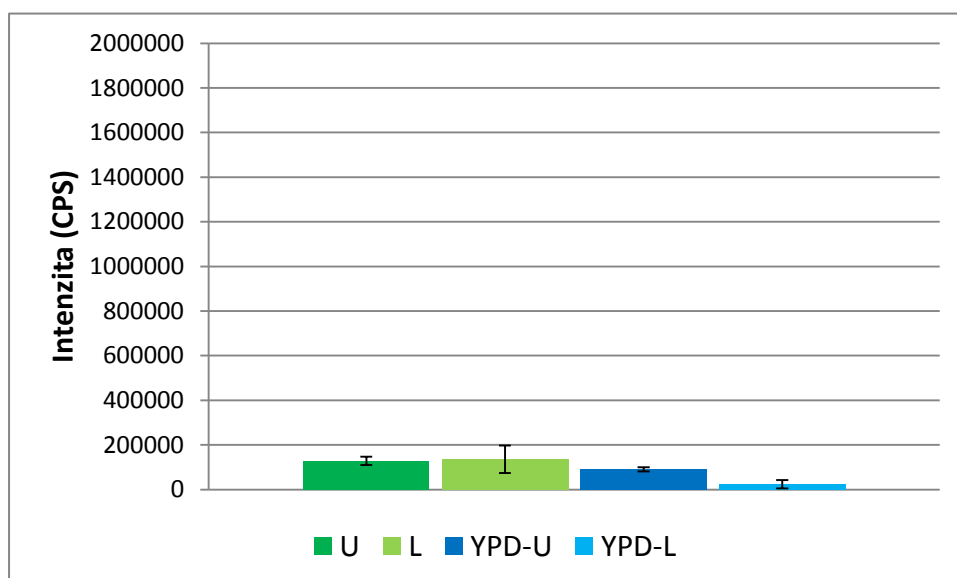
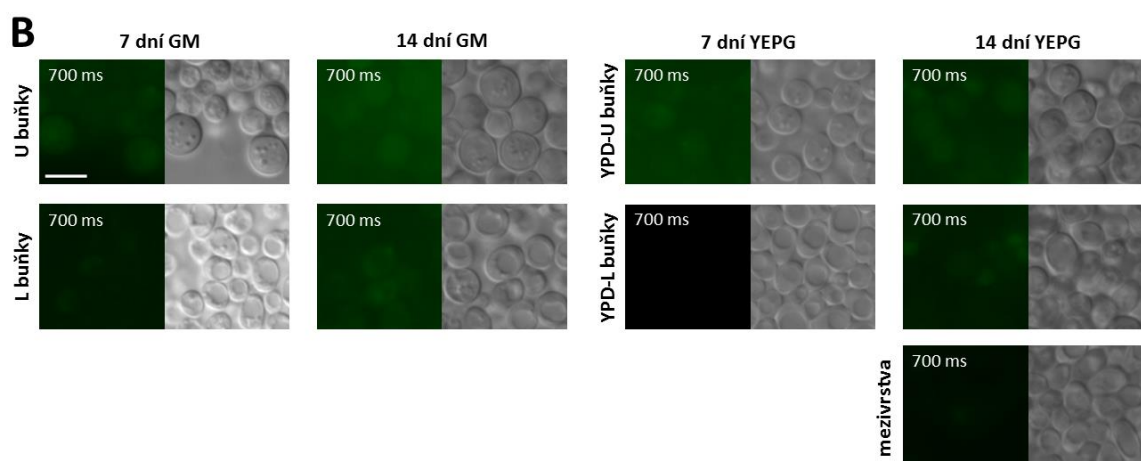


Graf 5.15: Intenzita fluorescence proteinu Fbp1p u buněčných typů izolovaných z tekutých kultur. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.



Obrázek 5.23:

(A) Vertikální řezy kolonií produkujících fluorescenčně značený protein Fbp1p. (B) Snímky jednotlivých buněčných typů starých 7 a 14 dní. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μm.

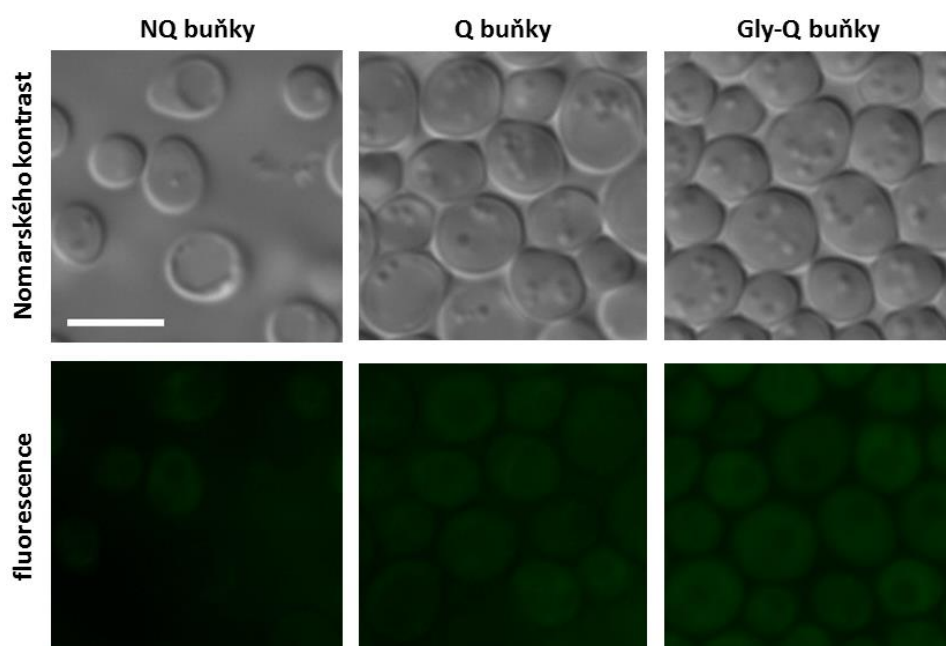


Graf 5.16: Intenzita fluorescence proteinu Fbp1p u buněčných typů izolovaných ze 14 dní starých kolonií. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.

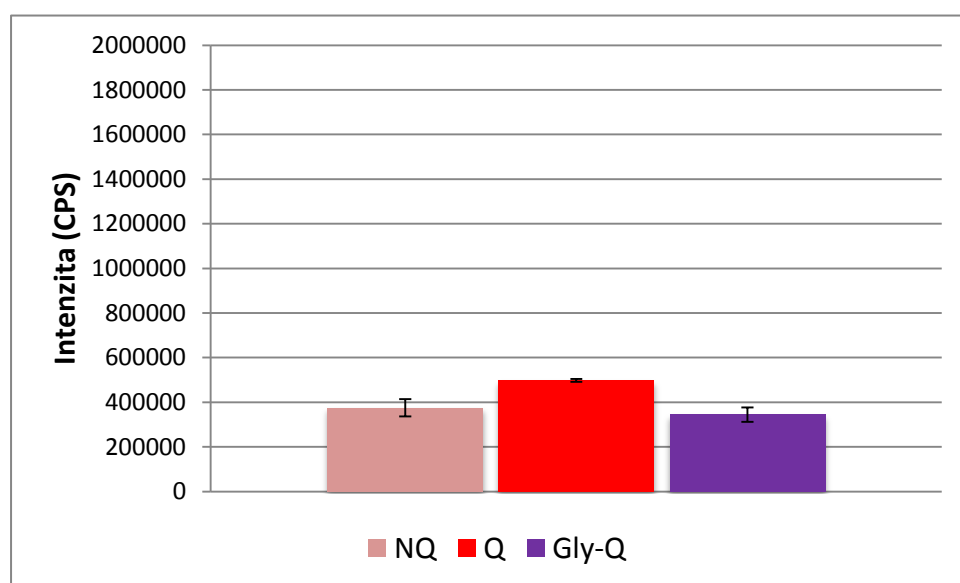
5.4.9 BY4742:*RPL22A-EGFP*

U tekutých kultur byla úroveň exprese ribozomálního proteinu Rpl22ap nejvyšší u Q buněk. U zbylých dvou buněčných typů byla úroveň exprese Rpl22ap na přibližně stejné úrovni (graf 5.17) (obrázek 5.24).

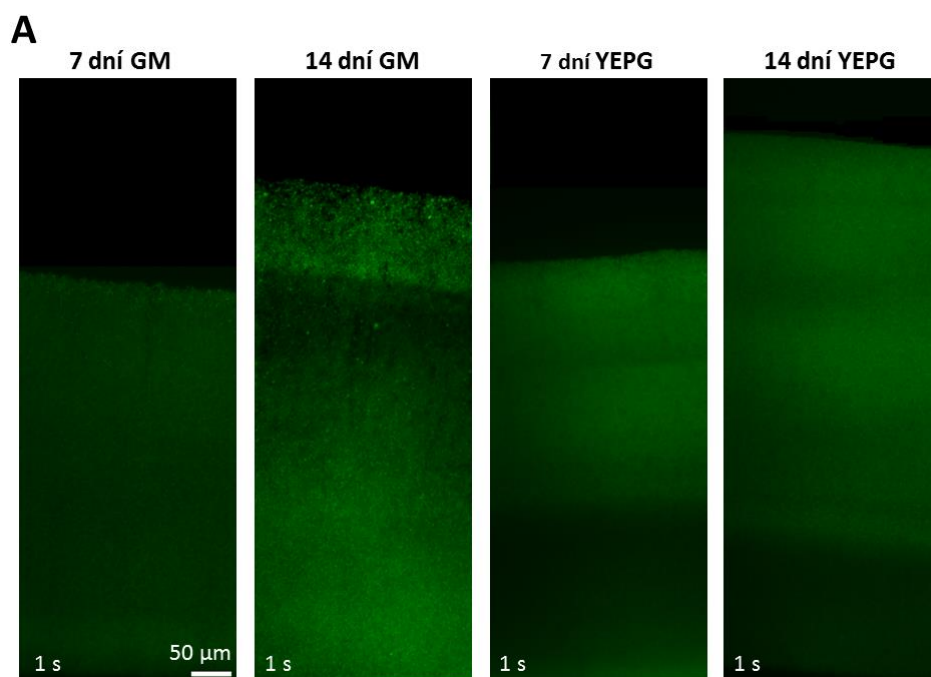
U buněčných typů izolovaných z kolonií byla zvýšená exprese u odolnějších buněk lokalizovaných v horní části kolonie (graf 5.18) (obrázek 5.25).



Obrázek 5.24: Snímky buněčných typů izolovaných ze 7 dní starých tekutých kultur. Zobrazené měřítko odpovídá 5 µm. Doba expozice všech snímků byla 700 ms.

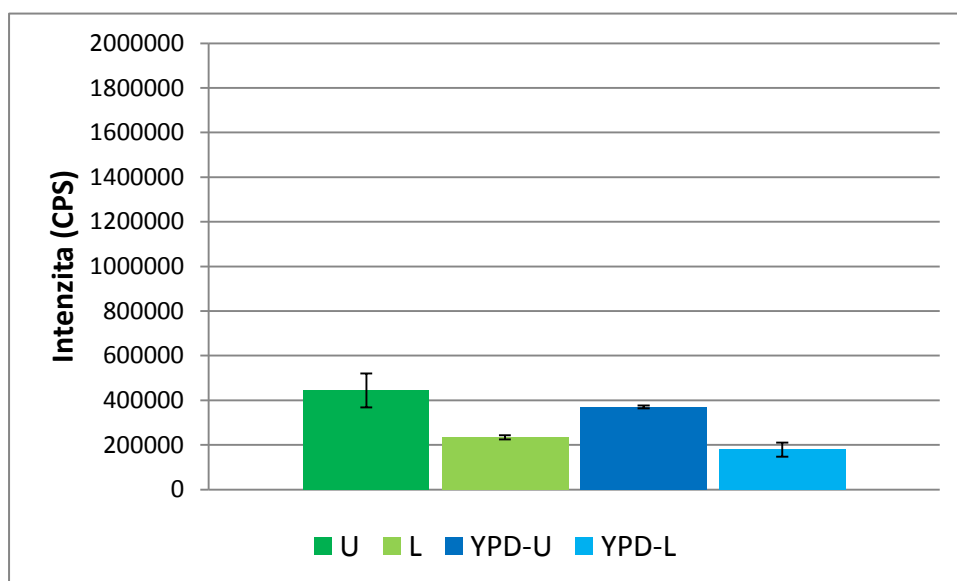
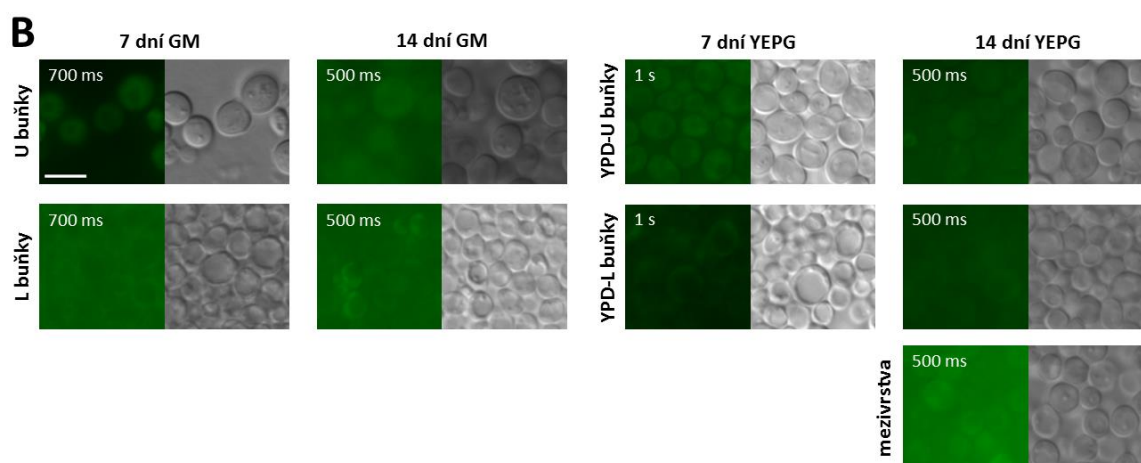


Graf 5.17: Intenzita fluorescence proteinu Rpl22ap u buněčných typů izolovaných z tekutých kultur. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.



Obrázek 5.25:

(A) Vertikální řezy kolonií produkujících fluorescenčně značený protein Rpl22ap. (B) Snímky jednotlivých buněčných typů starých 7 a 14 dní. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μ m.

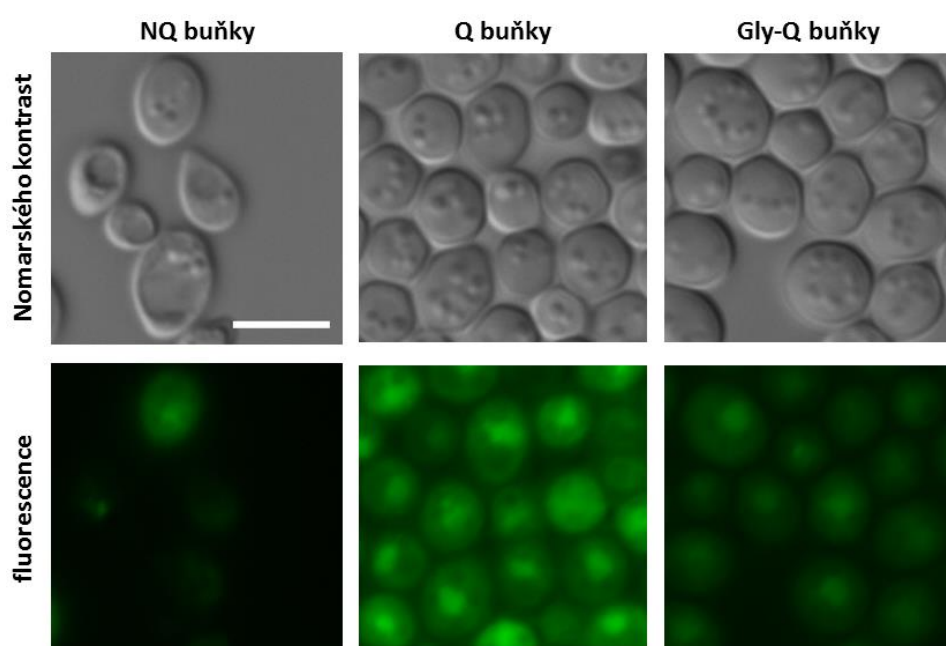


Graf 5.18: Intenzita fluorescence proteinu Rpl22ap u buněčných typů izolovaných ze 14 dní starých kolonií. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.

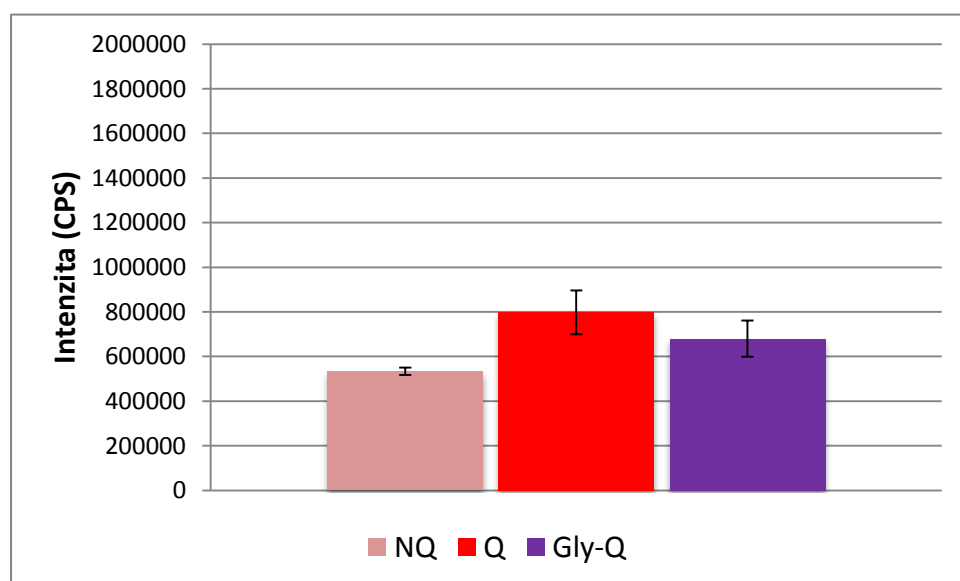
5.4.10 BY4742:ACS1-EGFP

Acetyl-koenzym A syntáza Acs1p je proteinem vyskytujícím se ve velké míře v Q buňkách (Davidson et al., 2011). Úroveň exprese je vysoká u všech buněčných typů izolovaných z tekutých kultur (graf 5.19) (obrázek 5.26).

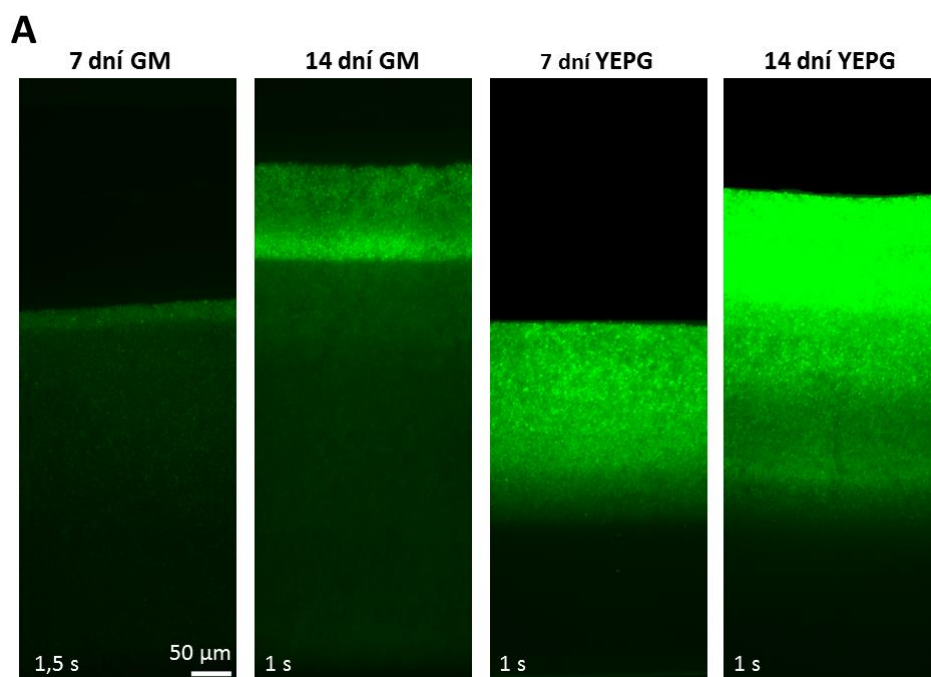
Expres v Acs1p v rámci kolonie je vysoká především u buněčných typů izolovaných z její vrchní části (obrázek 5.27). K expresi proteinu u YPD-L buněk takřka vůbec nedochází (graf 5.20). U Gly-Q, Q a U buněk bylo pomocí fluorescenčního barvení DNA zjištěno, že protein je lokalizován v buněčném jádře (obrázek 5.28).



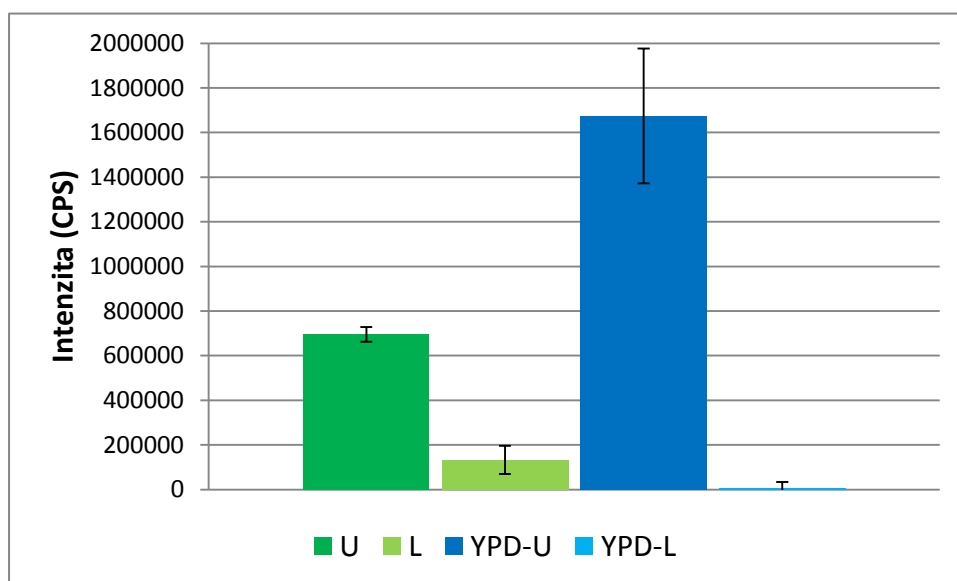
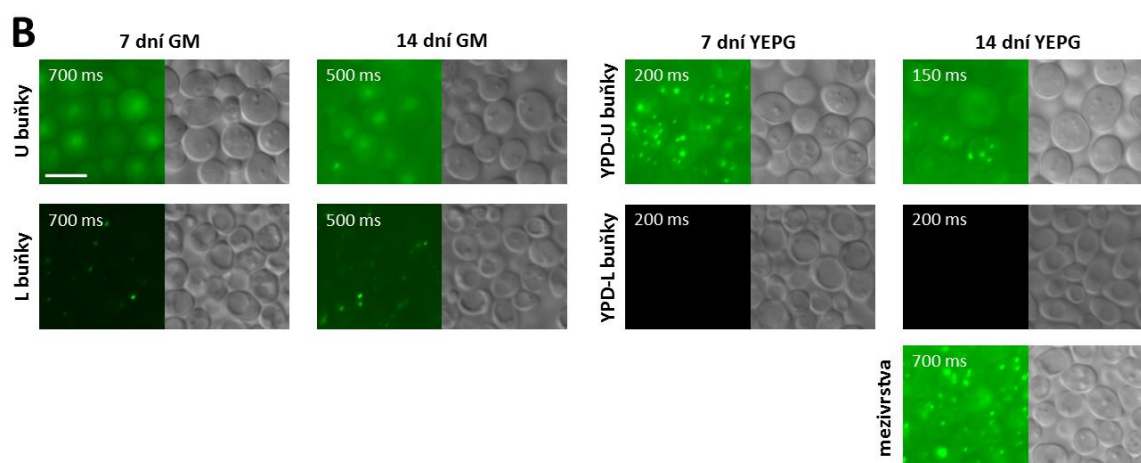
Obrázek 5.26: Snímky buněčných typů izolovaných ze 7 dní starých tekutých kultur. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μ m. Doba expozice všech snímků byla 700 ms.



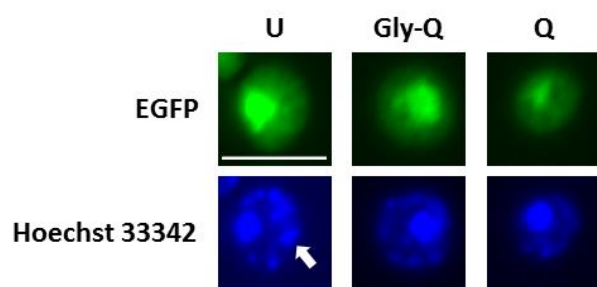
Graf 5.19: Intenzita fluorescence proteinu Acs1p u buněčných typů izolovaných z tekutých kultur. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.



Obrázek 5.27:
 (A) Vertikální řezy kolonií produkujících fluorescenčně značený protein Acs1p. (B) Snímky jednotlivých buněčných typů starých 7 a 14 dní. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μm.



Graf 5.20:
 Intenzita fluorescence proteinu Acs1p u buněčných typů izolovaných ze 14 dní starých kolonií. Od zobrazených hodnot byla odečtena autofluorescence jednotlivých buněčných typů.

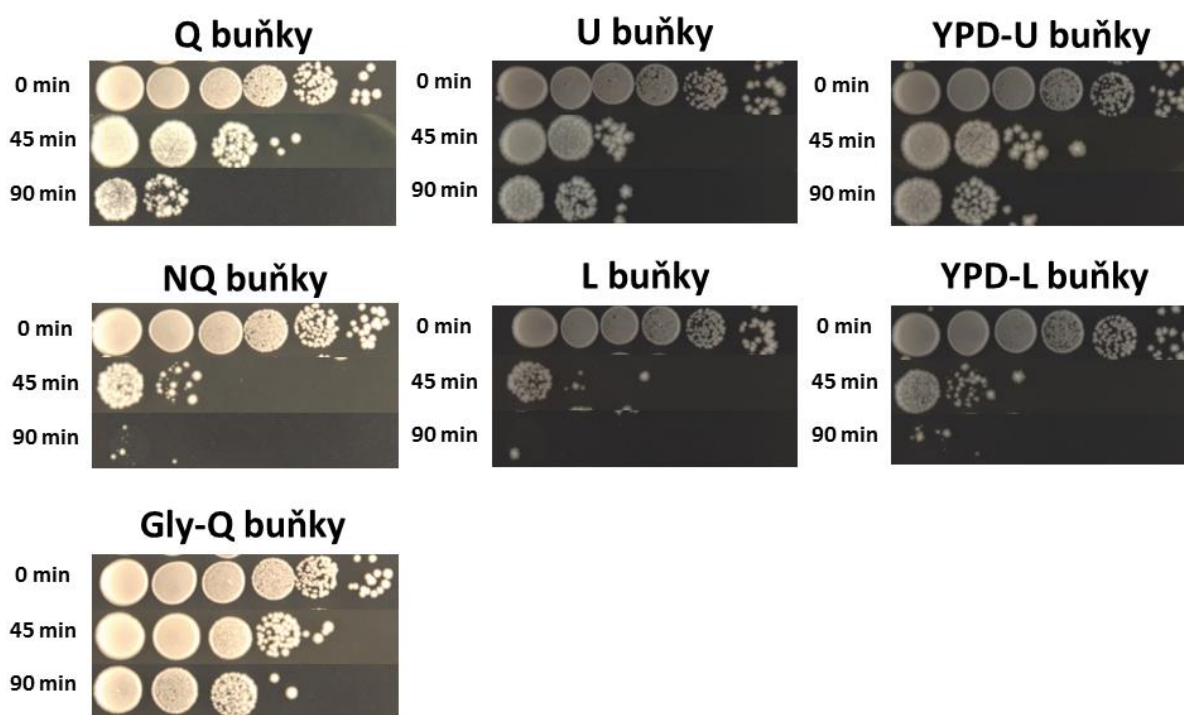


Obrázek 5.28: Barvení jader vybraných buněčných typů pomocí modré fluorescenční barvy Hoechst 33342. Bílá šipka označuje obarvenou mitochondriální DNA. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μm .

5.5 Stresová odolnost izolovaných buněčných populací

5.5.1 Odolnost vůči teplotnímu šoku

Teplotní odolnost jednotlivých typů buněk byla porovnána pomocí metody popsané v kapitole 3.2.13. Nejvyšší odolnost vůči teplotnímu šoku vykazovaly Gly-Q buňky, jež po dobu 90 minut odolávaly teplotě 52°C i v koncentraci buněk 0,1 mg/ml (obrázek 5.29). Q, U a YPD-U buňky vykazovaly srovnatelnou odolnost a odolávaly výše zmíněné teplotě po dobu 90 minut při koncentraci buněk 1 mg/ml. Vystavení teplotě 52°C po dobu 90 minut bylo pro NQ, L a YPD-L buňky letální takřka ve všech koncentracích. V koncentraci 10 µg/ml přežilo pouze několik buněk

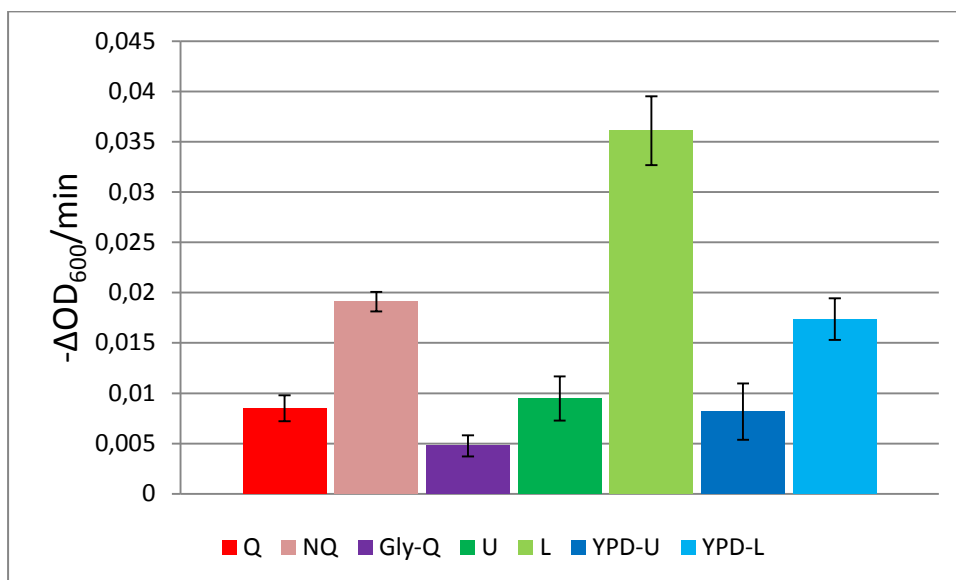


Obrázek 5.29: Kapková metoda použitá při porovnání teplotní odolnosti jednotlivých typů buněk. Zobrazené snímky byly pořízeny po čtyřech dnech od nakapání kapek o objemu 10 µl.

5.5.2 Citlivost k účinkům zymolyázy

U 7 dní starých buněk izolovaných z tekutých kultur a 14 dní starých buněk izolovaných z kolonií byla měřena citlivost k účinkům zymolyázy jako úbytek optické denzity v čase. Analýza ukázala, že nejcitlivějším buněčným typem jsou L buňky (graf 5.21). Zhruba o polovinu nižší citlivost byla naměřena u YPD-L a NQ buněk. Q, U a YPD-U buňky byly

k zymolyáze přibližně třikrát méně citlivé než L buňky. Nejodolnějším buněčným typem byly podobně jako u analýzy odolnosti k teplotnímu šoku Gly-Q buňky.



Graf 5.21: Citlivost jednotlivých buněčných typů k účinkům zymolyázy.

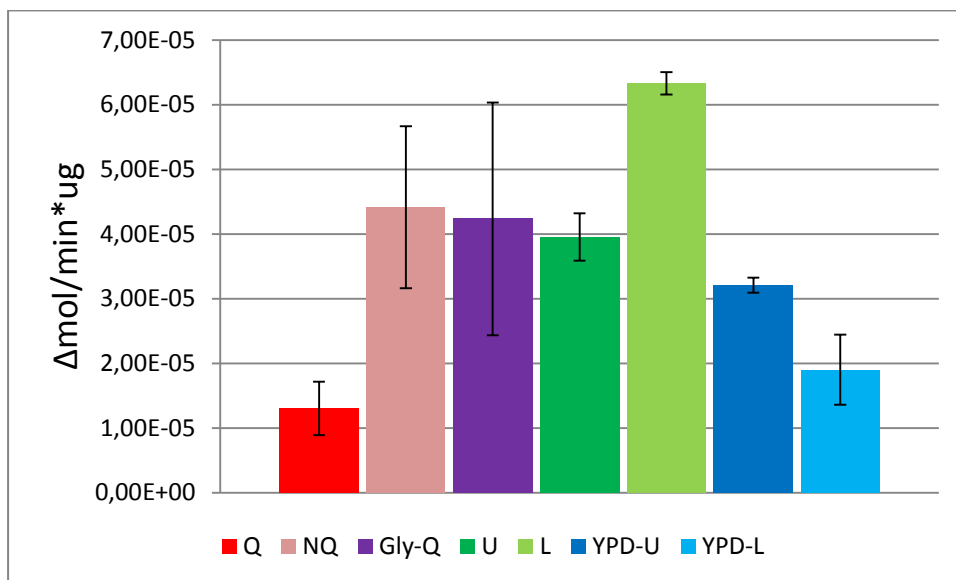
5.6 Porovnání vybraných metabolických procesů jednotlivých buněčných populací

5.6.1 Enzymatická aktivita

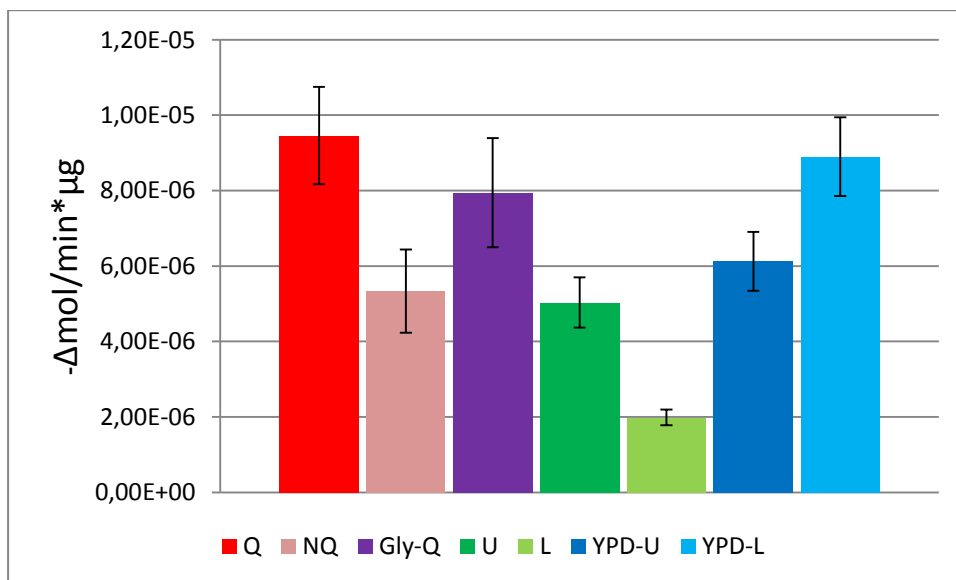
U všech izolovaných buněčných typů byla měřena aktivita enzymu fermentativní dráhy pyruvát dekarboxylázy (PDC) a enzymu respirativního metabolismu isocitrát lyázy (ICL). U kolonií rostoucích na glycerolovém médiu byla aktivita ICL vyšší u L buněk lokalizovaných ve spodní části kolonie, zatímco aktivita PDC byla vyšší u U buněk lokalizovaných v horní části kolonie. U kolonií rostoucích na glukózovém médiu byly aktivity enzymů v rámci kolonie opačné. Vyšší aktivita ICL byla naměřena u YPD-U, zatímco vyšší aktivita PDC byla neměřena u YPD-L buněk.

Porovnání buněčných typů z tekutého glukózového média je podobné jako u kolonií rostoucích na glycerolovém médiu. NQ buňky vykazovaly podobně jako L buňky vyšší aktivitu ICL, nicméně absolutní hodnoty aktivity byly na výrazně nižší úrovni oproti U a L buňkám. Naopak Q buňky vykazovaly podobně jako U buňky vyšší aktivitu PDC. Zde byly naopak hodnoty naměřené u buněčných typů z tekutého YEPG média výrazně vyšší než u buněk

z kolonií rostoucích na glycerolovém médiu. Aktivita obou enzymů v Gly-Q buňkách byla v porovnání s ostatními buněčnými typy relativně vysoká, ovšem v případě měření aktivity ICL musíme zohlednit vysokou hodnotu směrodatné odchylky. Pro porovnání aktivity enzymů mezi jednotlivými buněčnými typy viz graf 5.22 a graf 5.23.



Graf 5.22: Aktivita enzymu izocitrát lyázy.



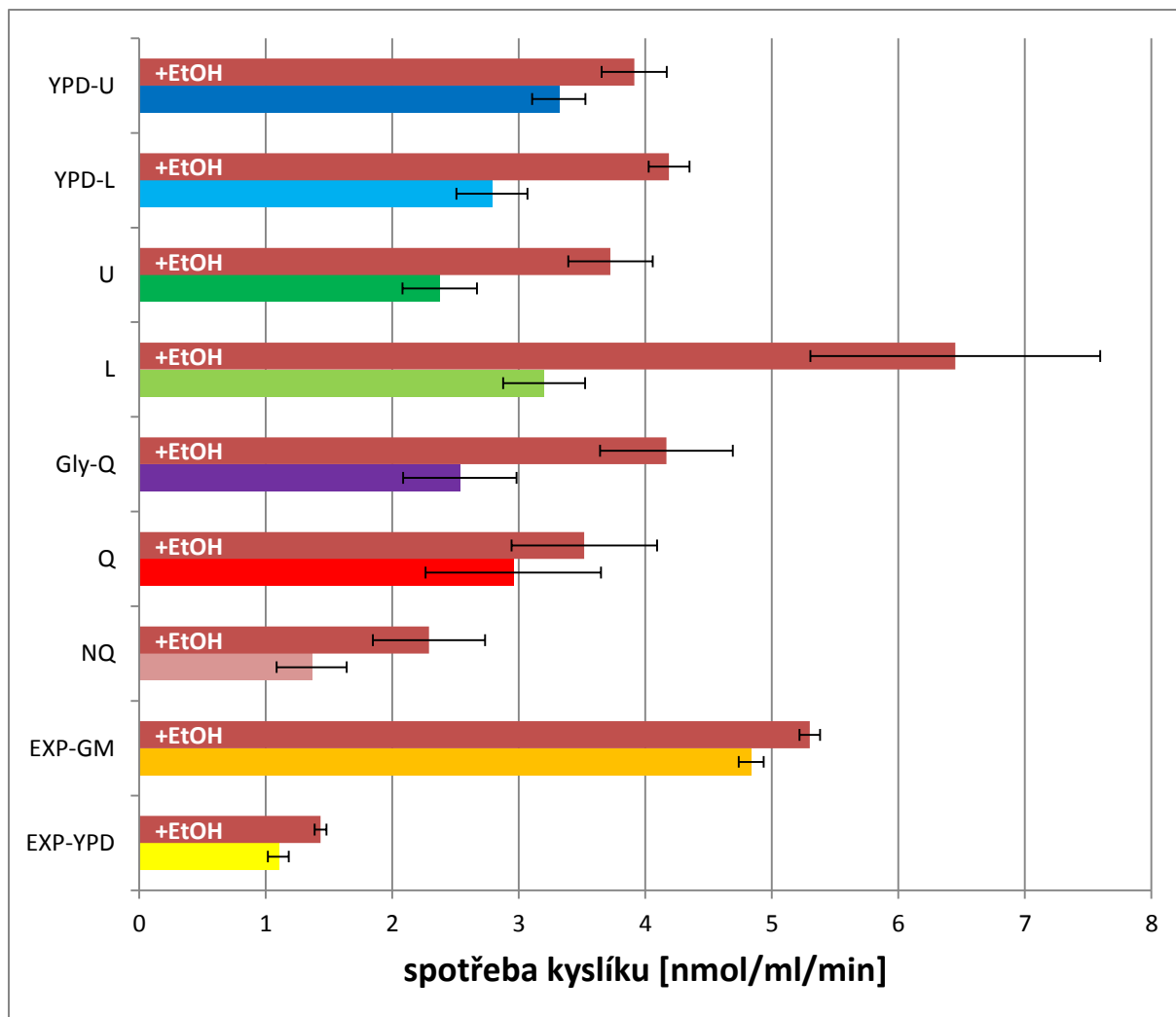
Graf 2.23: Aktivita enzymu pyruvát dekarboxylázy.

5.6.2 Respirace

U izolovaných buněčných typů byla měřena spotřeba kyslíku před a po přidání substrátu ve formě ethanolu, jenž je kvasinkami využíván respirativní formou, během které spotřeba kyslíku stoupá.

U kolonií rostoucích na glycerolovém médiu byla v rámci kolonie spotřeba kyslíku před přidáním substrátu o 34% vyšší u izolovaných L buněk než u izolovaných U buněk. Po přidání ethanolu se rozdíl ve spotřebě kyslíku zvýraznil a L buňky spotřebovávaly o 72% kyslíku více než U buňky. U kolonií rostoucích na glukózovém médiu měly buňky horní vrstvy kolonie (YPD-U) vyšší spotřebu než buňky ze spodní vrstvy kolonie (YPD-L) (graf 5.24). Po přidání ethanolu byla ovšem spotřeba kyslíku obou buněčných typů izolovaných z kolonií rostoucích na YEPG médiu takřka shodná.

V rámci tekutých kultur měly nejnižší spotřebu kyslíku NQ buňky. Úroveň respirace NQ buněk před přidáním ethanolu se blížila spotřebě kyslíku buněk fermentujících glukózu (EXP-YPD), které se nacházely v exponencionální fázi růstu. Spotřeba kyslíku Gly-Q a Q buněk byla oproti NQ buňkám zhruba dvojnásobná.



Graf 5.24: Spotřeba kyslíku jednotlivých buněčných typů před a po přidání ethanolu. Pro porovnání jsou zahrnuty buňky z exponenciální fáze růstu tekutých kultur, které by měly při růstu na glukózovém médiu potlačovat respirativní metabolismus (glukózová represe) a při růstu na glycerolovém médiu naopak dosahovat vysokých hodnot respirativní kapacity. EXP-YPD jsou tekuté kultury v exponenciální fázi růstu (4 hodiny po inokulaci) rostoucí v tekutém glukózovém médiu. EXP-GM jsou 4 hodiny staré buňky v exponenciální fázi růstu rostoucí v tekutém glycerolovém médiu.

5.7 Souhrnná tabulka výsledků

Tato kapitola obsahuje souhrnnou tabulku, ve které jsou v rámci jednotlivých populací vzájemně porovnány všechny měřené parametry izolovaných buněčných typů (tabulka 5.2). Jelikož byl z glycerolového tekutého média izolován pouze jeden buněčný typ, je v tabulce porovnán stejně jako NQ buňky s výsledky Q buněk.

typ média	YEPG tekuté	GM tekuté	YEPG pevné	GM pevné
počet izolovaných buněčných typů	2	1	2	2
tloušťka buněčné stěny	Q>NQ	Gly-Q~Q	YPD-U>YPD-L	U>L
počet lipidických tělísek	Q>NQ	Gly-Q~Q	YPD-U>YPD-L	U>L
exprese <i>ATO3</i>	Q>NQ	Gly-Q>Q	YPD-U>YPD-L	U>L
exprese <i>INO1</i>	Q>NQ	Gly-Q~Q	YPD-U>YPD-L	U<L
exprese <i>MET17</i>	Q>NQ	Gly-Q~Q	YPD-U>YPD-L	U>L
exprese <i>OLE1</i>	Q>NQ	Gly-Q~Q	YPD-U>YPD-L	U<L
exprese <i>POX1</i>	Q>NQ	Gly-Q>Q	YPD-U>YPD-L	U>L
exprese <i>CIT1</i>	Q>NQ	Gly-Q<Q	YPD-U>YPD-L	U<L
exprese <i>NCE102</i>	Q>NQ	Gly-Q>Q	YPD-U>YPD-L	U>L
exprese <i>FBP1</i>	Q~NQ	Gly-Q>Q	YPD-U>YPD-L	U~L
exprese <i>RPL22A</i>	Q>NQ	Gly-Q<Q	YPD-U>YPD-L	U>L
exprese <i>ACS1</i>	Q>NQ	Gly-Q<Q	YPD-U>YPD-L	U>L
teplotní rezistence	Q>NQ	Gly-Q>Q	YPD-U>YPD-L	U>L
rezistence k zymolyáze	Q>NQ	Gly-Q>Q	YPD-U>YPD-L	U>L
aktivita ICL	Q<NQ	Gly-Q>Q	YPD-U>YPD-L	U<L
aktivita PDC	Q>NQ	Gly-Q<Q	YPD-U<YPD-L	U>L
respirační kapacita	Q>NQ	Gly-Q~Q	YPD-U≥YPD-L	U<L

Tabulka 5.2: Porovnání zkoumaných parametrů u buněčných typů vyskytujících se v rámci jednotlivých populací. Kvůli absenci druhého buněčného typu v tekutém glycerolovém médiu, byly Gly-Q buňky porovnány s Q buňkami.

6 Diskuze

6.1 Metody izolace diferenciovaných kvasinkových buněk

Pro izolaci jednotlivých buněčných typů z heterogenních kvasinkových populací jsou používány dvě metody, jež jsou obě založeny na separaci buněk na základě jejich vznášivé hustoty. První z nich je metoda dělení na Percollovém gradientu používaná pro izolaci buněk z tekutých kultur (Allen et al., 2006; Benbadis et al., 2009). Druhou metodou je dělení na sacharózovém gradientu používaná pro dělení buněk z obřích kolonií (Čáp et al., 2012a). Obě tyto metody mají svá pozitiva a negativa, která musí být zohledněna při plánování experimentů a následné prezentaci výsledků.

Výhodou použití Percollového gradientu je vysoká účinnost separace jednotlivých buněčných typů a jejich snadné odebrání. V případě, že nedojde k dokonalému rozdělení populace Q a NQ buněk, můžeme celý proces dělení nejméně jednou opakovat (Allen et al., 2006), aniž by došlo k výrazným morfologickým změnám buněk, což nám umožní získat vysoce homogenní buněčné frakce bez příměsí druhého buněčného typu. Nebylo ověřeno, zdali je možno dělení buněk vícekrát opakovat, aniž by u nich nedošlo k morfologickým a fyziologickým změnám. Jelikož se buňky v průběhu separace dostávají dlouhodobě do odlišného prostředí (zejména buňky kolonií), můžeme předpokládat, že k určitým změnám může docházet. Nevýhodou metody je její časová náročnost a vysoká cena Percollu.

Výhodou metody dělení na sacharózovém gradientu je její nízká cena a rychlost separace. Sacharóza je ovšem pro kvasinky vydatným energetickým zdrojem, který po určité době indukuje výstup z klidové fáze, což vede k morfologickým, fyziologickým a metabolickým změnám buněk. V případě nepovedené separace není tedy možné dělení opakovat. Ve srovnání s Percollovým gradientem jsou izolované frakce buněk více heterogenní. Úroveň heterogenity může být minimalizována manuální precizností při odběru jednotlivých frakcí a následnou kontrolou pod světelným mikroskopem.

Obě metody jsou použitelné pro dělení kolonií i tekutých kultur. Pro analýzu velkého množství vzorků je z časových důvodů vhodné zvolit sacharózový gradient. Percollový gradient je vhodný především pro kvalitativní analýzu malého množství vzorků, u nichž i malé množství kontaminace odlišnou frakcí buněk může ovlivnit naměřené hodnoty zkoumaného parametru.

Jako alternativa sacharózového gradientu může být použit gradient sorbitolový, jenž není na rozdíl od sacharózy bohatým energetickým zdrojem a nedochází v něm k tak rychlým morfologickým a fyziologickým změnám. Metoda dělení buněk na sorbitolovém gradientu je

používána jako alternativa sacharózového gradientu v laboratoři kvasinkových kolonií a je ověřeno, že má obdobnou účinnost separace jako gradient sacharózový. Při vypracování této práce byl sorbitolový gradient použit jako kontrola při měření vybraných metabolických aktivit. Účinnost separace byla v porovnání se sacharózovým gradientem totožná a hodnoty měřených parametrů se u shodných buněčných typů izolovaných v odlišném gradientu nelišily.

6.2 Diferenciace kvasinkových populací laboratorních kmenů kvasinek

Výzkum diferenciace kvasinkových populací v laboratorních podmínkách se v současné době dělí na dva hlavní směry. Prvním směrem je výzkum obřích kolonií rostoucích na agarovém médiu (Čáp et al., 2012a) a druhým z nich je výzkum diferenciace tekutých kvasinkových kultur (Allen et al., 2006; Aragon et al., 2006; Aragon et al., 2008; Benbadis et al., 2009; Davidson et al., 2011).

Horizontální a vertikální diferenciace kvasinkových kolonií byla studována a popsána na základě analýzy buněk rostoucích na respiračním médiu (Čáp et al., 2012a; Váchová and Palková, 2005). Jedním z cílů této práce bylo charakterizovat morfologii a vertikální diferenciaci kolonií rostoucích na fermentačním médiu obsahujícím glukózu. Výsledky práce ukázaly, že na fermentačním médiu dochází k rychlejšímu horizontálnímu růstu kolonie a k zvlnění jejích okrajů, což je pravděpodobně způsobeno přítomností zdroje uhlíku ve formě glukózy, který umožňuje rychlý růst a expanzi okrajových částí kolonie do prostoru. V centrální části kolonie můžeme po 14 dnech pozorovat výraznou prohlubeň. Ta pravděpodobně vzniká na základě rozdílu vertikálního růstu okrajových a centrálních částí kolonie, způsobeným nerovnoměrnou distribucí živin v rámci kolonie, kde dochází k dřívějšímu vyčerpání živin z agaru v oblasti středu kolonie.

U kolonií rostoucích na glycerolovém médiu začíná být patrné vertikální rozdělení do dvou vrstev po 7 dnech od nakapání buněčné suspenze na médium. Během dalších 7 dní dochází k nárůstu obou vrstev. Po 14 dnech růstu kolonie můžeme na příčných řezech pozorovat dvě výrazně ohraničené morfologicky a fyziologicky odlišné populace buněk, z nichž horní je tvořena U buňkami a dolní L buňkami (Čáp et al., 2012a). U kolonií rostoucích na médiu obsahujícím glukózu můžeme po čtrnácti dnech růstu pozorovat tři výrazné vrstvy buněk. Svrchní a spodní vrstva je tvořena buňkami morfologicky podobnými U a L buňkám, které byly nově pojmenovány jako YPD-U a YPD-L buňky. Prostřední vrstva kolonie je tvořena buňkami dvou typů, které jsou morfologicky podobné YPD-U a YPD-L.

Nemůžeme potvrdit ani vyloučit, že tato mezivrstva je tvořena kombinací YPD-L a YPD-U buněk nebo doposud nepopsanými typy buněk, neboť ji na základě vznášivé hustoty není možno izolovat od horní a dolní vrstvy buněk. Mezivrstva není na vertikálním řezu 7 dní starých kolonií patrná, tudíž k jejímu vývoji patrně dochází až v pozdějších fázích růstu kolonie. Kolonie rostoucí na glukózovém médiu mají odlišný vývoj a na rozdíl od kolonií rostoucích na glycerolovém médiu vytváří během 7-14 dne růstu mezivrstvu heterogenní populace buněk.

Diferenciace populací kvasinek rostoucích v tekutém médiu byla poprvé popsána v práci (Allen et al., 2006). Kvasinky rostoucí v tekutém na glukózu bohatém médiu vytvářejí po vyčerpání živin dva morfologicky a fyziologicky odlišné buněčné typy (Q a NQ buňky), které se dají snadno separovat na Percollovém gradientu (Allen et al., 2006). Cílem této práce bylo ověřit, zda dochází k diferenciaci u kvasinek rostoucích v glycerolovém médiu, a následně nově izolované buňky podrobit analýze a srovnání s buněčnými typy izolovanými z jiných druhů médií. Z glycerolových kultur se podařilo izolovat pouze jeden buněčný typ, který je svou morfologií a stresovou odolností podobný vysoce odolným U, YPD-U a Q buňkám a byl označen jako Gly-Q. Analýza 3-15 dní starých kultur neodhalila přítomnost dalšího buněčného typu, který by byl obdobou NQ buněk z tekutých kultur rostoucích v glukózovém médiu. Na základě tohoto pozorování se nabízejí dva modely vývoje glycerolové kultury.

- Populace buněk se přizpůsobí nepříznivým podmínkám pro růst a k diferenciaci nedochází.
- Dochází k diferenciaci a tvorbě stresově vysoce senzitivního buněčného typu, jenž nepřežívá více jak 3 dny od zaočkování.

6.3 Porovnání buněčných typů

6.3.1 Stresová odolnost

U všech buněčných typů byla měřena odolnost vůči zvýšené teplotě a účinkům zymolýzy. Odolnost k účinkům zymolýzy byla v rámci kolonie rostoucí na glycerolovém médiu přibližně třikrát vyšší u U buněk oproti L buňkám, což se shoduje s výsledky publikovanými v práci (Čáp et al., 2012a). U kolonií rostoucích na glukózovém médiu jsou YPD-U přibližně stejně odolné jako U buňky, ovšem YPD-L buňky jsou pouze dvakrát citlivější. Takřka totožné hodnoty byly naměřeny také u tekutých glukózových kultur,

kde jsou Q buňky přibližně dvakrát odolnější než NQ buňky. Nejvyšší odolnost v porovnání s ostatními buněčnými typy byla naměřena u Gly-Q buněk.

U a Q buňky jsou v rámci populace odolnější vůči teplotnímu šoku než L a NQ (Allen et al., 2006; Čáp et al., 2012a), což výsledky této práce potvrdily. YPD-U vykazovaly takřka shodnou odolnost jako Q a U buňky a YPD-L byly náchylné ke zvýšené teplotě podobně jako L a NQ buňky. Gly-Q buňky byly opět v porovnání s ostatními buněčnými typy nejodolnější.

Kultury ze všech studovaných typů médií vytvářely jeden vysoce odolný typ buněk. Odolnost U, YPD-U a Q buněk je na podobné úrovni. Za vysoce odolný buněčný typ vůči výše zmíněným stresorům můžeme označit Gly-Q buňky.

6.3.2 Metabolická aktivita

U všech izolovaných buněčných typů byla měřena spotřeba kyslíku a aktivita enzymů pyruvát dekarboxylázy a isocitrát lyázy. Naměřené hodnoty enzymatické aktivity byly v případě ICL zhruba 1,5x vyšší u L buněk oproti U buňkám a v případě PDC přibližně 2,5x vyšší u U buněk oproti L buňkám. Tyto výsledky korelují s dosud nepublikovanými daty doktora Čápa. V rámci kolonií rostoucích na glukózovém médiu byla aktivita enzymů v jednotlivých vrstvách opačná. YPD-U buňky vykazovaly přibližně 1,7x vyšší aktivitu ICL a zhruba 1,5x nižší aktivitu PDC ve srovnání s YPD-L buňkami. U tekutých kultur rostoucích v glukózovém médiu byla aktivita PDC 1,8x vyšší u Q buněk a aktivita ICL 3,4x vyšší u NQ buněk. Tyto výsledky jsou překvapivé a jsou v rozporu s předpokladem, že NQ buňky nejsou schopny využít nefermentovatelné zdroje uhlíku, zatímco pro Q buňky je respirativní forma metabolismu hlavním příjmem energie, což naznačuje i úroveň spotřeby kyslíku tohoto typu buněk (Davidson et al., 2011). U Gly-Q buněk byly v porovnání s ostatními buněčnými typy naměřeny vysoké hodnoty aktivity obou enzymů, ačkoliv by se dalo předpokládat, že úroveň aktivity PDC bude vzhledem k počáteční absenci fermentovatelných zdrojů uhlíku velmi nízká.

Jak již bylo zmíněno, Q buňky spotřebovávají více kyslíku než NQ buňky (Davidson et al., 2011), což potvrzují i výsledky této práce. Poměr hodnot se ovšem oproti práci (Davidson et al., 2011) liší, to může být dáno jiným způsobem měření spotřeby kyslíku a separace buněk (V práci (Davidson et al., 2011) je uvedena spotřeba kyslíku Q buněk v porovnání s NQ buňkami cca 5x vyšší). Hodnoty spotřeby kyslíku jsou u L buněk vyšší než u U buněk. Po přidání ethanolu je spotřeba kyslíku L buněk přibližně dvojnásobná, stejný poměr je uveden v práci (Čáp et al., 2012a). U YPD-U a YPD-L nebyl mezi jednotlivými buněčnými

typy naměřen výraznější rozdíl ve spotřebě kyslíku. Úroveň respirace Gly-Q buněk se pohybuje na úrovni U buněk.

Z analýzy metabolické aktivity vyplývá, že morfologicky podobné buněčné typy sice vykazují obdobnou odolnost vůči stresu, ovšem jejich metabolismus se zásadně liší.

6.3.3 Exprese GFP proteinů

V rámci práce byla pozorována exprese deseti genů fúzovaných s *EGFP*. Exprese fluorescenčně značených proteinů v koloniích byla zkoumána na ultratenkých řezech (odebraných z kolonií po 7 a 14 dnech od nakapání), které poskytují přehled vertikálního rozvrstvení GFP signálu. U tekutých kultur byly pořízeny snímky jednotlivých buněčných typů izolovaných po sedmi dnech od zaočkování. Jelikož autofluorescence mezi buněčnými typy kolonií a tekutých kultur není rovnoměrně rozvrstvena, není možné použít snímky fluorescence z epifluorescenčního mikroskopu pro vzájemné porovnání exprese proteinu mezi buňkami z odlišných médií. Z tohoto důvodu byla na spektrofluorimetru měřena intenzita fluorescence jednotlivých buněčných typů, od které byla odečtena hodnota jejich autofluorescence. Pozorování fluorescence na mikroskopu můžeme použít v případě silného signálu pro orientační porovnání exprese značeného proteinu v rámci jedné populace buněk. V případě, že chceme porovnat dva buněčné typy izolované z odlišných médií či buňky se slabým signálem v rámci jedné populace, je vhodné měřit intenzitu fluorescence na spektrofluorimetru.

Fúzní protein Ato3p-EGFP je lokalizován především v horních vrstvách kolonií rostoucích na glycerolovém médiu a je typický pro U buňky (Čáp et al., 2012a). Účastní se transportu amoniaku, který slouží jako signalizační molekula mezi koloniemi a je důležitý pro vývoj kolonie (Palková et al., 2002; Palková et al., 1997). U doposud nediferenciované kolonie můžeme vystavením amoniaku indukovat tvorbu horní vrstvy U buněk (Čáp et al., 2012a). U kolonií rostoucích na pevném glukózovém médiu dochází k expresi proteinu Ato3p rovněž v horních vrstvách kolonie. I zde se amoniak s největší pravděpodobností účastní signalizace mezi koloniemi a ovlivňuje jejich růst a vývoj. U tekutých kultur byla výrazná produkce Ato3p zaznamenána pouze u Gly-Q buněk, což by mohlo znamenat, že u Gly-Q buněk také dochází ke komunikaci pomocí amoniaku. Další možností je regulace pomocí zvýšeného pH, protože exprese ATO genů je do jisté míry závislá na pH média (doposud nepublikované výsledky laboratoře prof. Palkové).

Ino1p a Met17p je u všech typů médií vysoce exprimován u stresově odolných buněk. Výjimku tvoří kolonie rostoucí na respiračním médiu, u kterých je podle práce (Čáp et al.,

2012a) exprese obou proteinů vyšší u L buněk v dolních vrstvách kolonie. Analýza exprese Ino1p této práce se shoduje s výsledky výše zmíněné práce, ovšem v případě proteinu Met17p byla exprese na vyšší v horních vrstvách kolonie, což je přesným opakem výsledků práce (Čáp et al., 2012a). Rozdíl ve výsledcích může být způsoben použitím kvasničního lyzátu jiné šarže. Podle analýz provedených v laboratoři prof. Palkové (nepublikované výsledky) se jednotlivé šarže stejného výrobce výrazně liší obsahem aminokyselin a zřejmě i jiných látek (vitaminů, oligopeptidů, oligosacharidů apod.).

Expresce proteinu Pox1p je vysoká především u U, YPD-U a Gly-Q buněk. Naopak u YPD-L a NQ buněk nebyl fluorescenční signál fúzního proteinu takřka vůbec zaznamenán. Na snímcích byla jasně patrná lokalizace v peroxizomech. Výsledky této práce potvrzují, že u kolonií rostoucích na glycerolovém médiu je Pox1p proteinem typickým pro U buňky (Čáp et al., 2012a)

Protein Ole1p je na základě práce (Čáp et al., 2012a) považován za typický pro L buňky. Výsledky práce se zmíněnou studií shodují. U ostatních buněčných typů je přítomnost tohoto proteinu velice nízká až nulová.

Membránový protein Nce102p je v rámci zkoumaných kvasinkových populací proteinem typickým pro stresově odolné typy buněk, což koreluje s výzkumem tekutých kultur (Davidson et al., 2011).

Protein Cit1p je typický především pro Q, YPD-U a Gly-Q buňky. U kolonií rostoucích na glycerolovém médiu je protein přítomen především v L buňkách. To je v souladu s výsledky práce (Davidson et al., 2011) a podporují hypotézu práce (Čáp et al., 2012a), že L buňky využívají především respirativní způsob metabolismu, zatímco spotřeba kyslíku U buněk je velmi nízká a zdroje uhlíku především fermentují.

Expresce proteinu Fbp1p byla u všech buněčných typů velmi nízká. Jeho exprese je pravděpodobně zvýšena v raných fázích růstu, poté se jeho exprese snižuje a je postupně degradován. Snížení intenzity fluorescence v průběhu času můžeme pozorovat během vývoje YPD-U buněk (obrázek 5.23).

Protein Acs1p můžeme považovat za typický protein pro odolné typy buněk (Davidson et al., 2011). U Q, Gly-Q a U buněk je protein lokalizován v jádře, kde se pravděpodobně účastní acetylace histonů (De Virgilio et al., 1992), zatímco u YPD-U, YPD-L, L a NQ buněk je protein přítomen ve shlucích, jejichž totožnost nebyla odhalena.

Ribozomální protein Rpl22ap byl v rámci kolonií přítomen spíše v horních vrstvách kolonie. U tekutých kultur byla přítomnost tohoto proteinu u Gly-Q a NQ buněk na

srovnatelné úrovni a u Q buněk byly naměřené hodnoty intenzity fluorescence v porovnání s NQ a Gly-Q buňkami vyšší. Nově zkonstruovaný kmen ovšem vykazoval zpomalený růst ve srovnání s rodičovským kmenem. Fúzní protein zřejmě ovlivňuje translaci. Nabízí se hypotéza, že Rpl22ap-EGFP je příčinou snížení či ztráty funkce velké ribozomální podjednotky, jež je kompenzována ribozomálními podjednotkami obsahující paralog Rpl22bp (Byrne and Wolfe, 2005), což může mít negativní vliv na proteosyntézu a tedy i růst.

Produkce enzymů Ino1p, Cit1p a Ole1p závisí stejně jako enzymové aktivity a respirativní kapacita na použitém kultivačním médiu, zatímco stresová odolnost a produkce některých proteinů není použitým typem kultivačního média příliš ovlivněna.

7 Souhrn

V rámci vypracování této práce zaměřené na diferenciaci kvasinkových populací bylo dosaženo následujících výsledků:

- Pomocí homologní rekombinace bylo zkonstruováno pět kmenů odvozených od laboratorního kmene BY4742 produkujících fúzní proteiny Cit1p-EGP, Nce102p-EGFP, Acs1p-EGFP, Fbp1p-EGFP a Rpl22a-EGFP. Kmeny byly pro další použití zařazeny do sbírky laboratoře kvasinkových kolonií.
- Pomocí separace buněk na sacharózovém gradientu byly izolovány, pojmenovány a charakterizovány tři nové buněčné typy (Gly-Q, YPD-U a YPD-L).
- Byla popsána vertikální diferenciaci a morfologie obřích kolonií kmene BY4742 rostoucích na glukózovém médiu.
- Byla analyzována a porovnána exprese vybraných proteinů v rámci jednotlivých kvasinkových populací.
- Byla porovnána stresová odolnost a vybrané metabolické procesy všech izolovaných buněčných typů.
- Kvasinky přizpůsobují svou fyziologii počínající limitaci živin v médiu a vytvářejí dlouhodobě vitální a vysoce odolný typ buněk. Mezi tyto buněčné typy můžeme zařadit Q, Gly-Q, U a YPD-U buňky. Na základě porovnání výsledků analýz všech buněčných typů byl vyvozen závěr, že buňky přizpůsobené k dlouhodobému přežívání mají vysokou odolnost vůči stresu a morfologii charakterizovanou zesílenou buněčnou stěnou a mnoha lipidickými tělísky, zatímco jejich metabolismus a syntéza mnoha proteinů se může lišit v závislosti na podmínkách kultivace.
- V rámci diplomové práce byl sepsán literální přehled shrnující aktuální poznatky o vývoji a diferenciaci laboratorních kmenů kvasinek.

8 Seznam použité literatury

Abeliovich, H., and Klionsky, D.J. (2001). Autophagy in yeast: mechanistic insights and physiological function. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 65, 463-479, table of contents.

Allen, C., Buttner, S., Aragon, A.D., Thomas, J.A., Meirelles, O., Jaetao, J.E., Benn, D., Ruby, S.W., Veenhuis, M., Madeo, F., *et al.* (2006). Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *The Journal of cell biology* 174, 89-100.

Ambroziak, J., and Henry, S.A. (1994). *INO2* and *INO4* gene products, positive regulators of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, form a complex that binds to the *INO1* promoter. *The Journal of biological chemistry* 269, 15344-15349.

Aragon, A.D., Quinones, G.A., Thomas, E.V., Roy, S., and Werner-Washburne, M. (2006). Release of extraction-resistant mRNA in stationary phase *Saccharomyces cerevisiae* produces a massive increase in transcript abundance in response to stress. *Genome biology* 7, R9.

Aragon, A.D., Rodriguez, A.L., Meirelles, O., Roy, S., Davidson, G.S., Tapia, P.H., Allen, C., Joe, R., Benn, D., and Werner-Washburne, M. (2008). Characterization of differentiated quiescent and nonquiescent cells in yeast stationary-phase cultures. *Molecular biology of the cell* 19, 1271-1280.

Bagnat, M., Keranen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Simons, K. (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 3254-3259.

Benaroudj, N., Lee, D.H., and Goldberg, A.L. (2001). Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *The Journal of biological chemistry* 276, 24261-24267.

Benbadis, L., Cot, M., Rigoulet, M., and Francois, J. (2009). Isolation of two cell populations from yeast during high-level alcoholic fermentation that resemble quiescent and nonquiescent cells from the stationary phase on glucose. *FEMS yeast research* 9, 1172-1186.

Binda, M., Peli-Gulli, M.P., Bonfils, G., Panchaud, N., Urban, J., Sturgill, T.W., Loewith, R., and De Virgilio, C. (2009). The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex. *Molecular cell* 35, 563-573.

Blanda, C., and Hofken, T. (2013). Regulation of mating in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* by the zinc cluster proteins Sut1 and Sut2. *Biochemical and biophysical research communications* 438, 66-70.

Boer, V.M., Crutchfield, C.A., Bradley, P.H., Botstein, D., and Rabinowitz, J.D. (2010). Growth-limiting intracellular metabolites in yeast growing under diverse nutrient limitations. *Molecular biology of the cell* 21, 198-211.

Bonfils, G., Jaquenoud, M., Bontron, S., Ostrowicz, C., Ungermann, C., and De Virgilio, C. (2012). Leucyl-tRNA synthetase controls TORC1 via the EGO complex. *Molecular cell* 46, 105-110.

Byrne, K.P., and Wolfe, K.H. (2005). The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome research* 15, 1456-1461.

Cardoso, H., and Leao, C. (1992). Sequential inactivation of ammonium and glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *FEMS microbiology letters* 73, 155-159.

Carlson, M. (1999). Glucose repression in yeast. *Current opinion in microbiology* 2, 202-207.

Carroll, A.S., and O'Shea, E.K. (2002). Pho85 and signaling environmental conditions. *Trends in biochemical sciences* 27, 87-93.

Clausen, M.K., Christiansen, K., Jensen, P.K., and Behnke, O. (1974). Isolation of lipid particles from baker's yeast. *FEBS letters* 43, 176-179.

Coller, H.A., Sang, L., and Roberts, J.M. (2006). A new description of cellular quiescence. *PLoS biology* 4, e83.

Cot, M., Loret, M.O., Francois, J., and Benbadis, L. (2007). Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *FEMS yeast research* 7, 22-32.

Coutinho, C., Bernardes, E., Félix, D., and Panek, A.D. (1988). Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains. *Journal of biotechnology* 7, 23-32.

Cyrne, L., Martins, L., Fernandes, L., and Marinho, H.S. (2003). Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. *Free radical biology & medicine* 34, 385-393.

Czabany, T., Wagner, A., Zweytick, D., Lohner, K., Leitner, E., Ingolic, E., and Daum, G. (2008). Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 283, 17065-17074.

Čáp, M., Štěpánek, L., Harant, K., Váchová, L., and Palková, Z. (2012a). Cell differentiation within a yeast colony: metabolic and regulatory parallels with a tumor-affected organism. *Molecular cell* 46, 436-448.

Čáp, M., Váchová, L., and Palková, Z. (2009). Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense. *The Journal of biological chemistry* 284, 32572-32581.

Čáp, M., Váchová, L., and Palková, Z. (2012b). Reactive oxygen species in the signaling and adaptation of multicellular microbial communities. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012, 976753.

Davidson, G.S., Joe, R.M., Roy, S., Meirelles, O., Allen, C.P., Wilson, M.R., Tapia, P.H., Manzanilla, E.E., Dodson, A.E., Chakraborty, S., *et al.* (2011). The proteomics of quiescent and nonquiescent cell differentiation in yeast stationary-phase cultures. *Molecular biology of the cell* 22, 988-998.

De Virgilio, C. (2012). The essence of yeast quiescence. *FEMS microbiology reviews* 36, 306-339.

De Virgilio, C., Burckert, N., Barth, G., Neuhaus, J.M., Boller, T., and Wiemken, A. (1992). Cloning and disruption of a gene required for growth on acetate but not on ethanol: the acetyl-coenzyme A synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 8, 1043-1051.

De Virgilio, C., Hottiger, T., Dominguez, J., Boller, T., and Wiemken, A. (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *European journal of biochemistry / FEBS* 219, 179-186.

Donahue, T.F., and Henry, S.A. (1981). myo-Inositol-1-phosphate synthase. Characteristics of the enzyme and identification of its structural gene in yeast. *The Journal of biological chemistry* 256, 7077-7085.

Essary, B.D., and Marshall, P.A. (2009). Assessment of FUN-1 vital dye staining: Yeast with a block in the vacuolar sorting pathway have impaired ability to form CIVS when stained with FUN-1 fluorescent dye. *Journal of microbiological methods* 78, 208-212.

Francois, J., and Parrou, J.L. (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* 25, 125-145.

Frohlich, F., Moreira, K., Aguilar, P.S., Hubner, N.C., Mann, M., Walter, P., and Walther, T.C. (2009). A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *The Journal of cell biology* 185, 1227-1242.

Gadd, G.M., Chalmers, K., and Reed, R.H. (1987). The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*, Vol 48.

Gershon, H., and Gershon, D. (2000). The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. *Mechanisms of ageing and development* 120, 1-22.

Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in enzymology* 350, 87-96.

Granot, D., and Snyder, M. (1991). Glucose induces cAMP-independent growth-related changes in stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5724-5728.

Granot, D., and Snyder, M. (1993). Carbon source induces growth of stationary phase yeast cells, independent of carbon source metabolism. *Yeast* 9, 465-479.

Gray, J.V., Petsko, G.A., Johnston, G.C., Ringe, D., Singer, R.A., and Werner-Washburne, M. (2004). "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 68, 187-206.

Hartwell, L.H., Mortimer, R.K., Culotti, J., and Culotti, M. (1973). Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of cdc Mutants. *Genetics* 74, 267-286.

Hedbacker, K., and Carlson, M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, 2408-2420.

Hedges, D., Proft, M., and Entian, K.D. (1995). CAT8, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 15, 1915-1922.

Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905-909.

Helliwell, S.B., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R., and Hall, M.N. (1994). TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Molecular biology of the cell* 5, 105-118.

Henry, S.A. (1973). Death resulting from fatty acid starvation in yeast. *Journal of bacteriology* 116, 1293-1303.

Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K.A., Maldener, C., Frohlich, K.U., Wissing, S., Buttner, S., Fehr, M., Sigrist, S., and Madeo, F. (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *The Journal of cell biology* 164, 501-507.

Herman, P.K. (2002). Stationary phase in yeast. *Current opinion in microbiology* 5, 602-607.

Hiltunen, J.K., Mursula, A.M., Rottensteiner, H., Wierenga, R.K., Kastaniotis, A.J., and Gurvitz, A. (2003). The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* 27, 35-64.

Hino, A., Mihara, K., Nakashima, K., and Takano, H. (1990). Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Applied and environmental microbiology* 56, 1386-1391.

Hoffman, C.S., and Winston, F. (1989). A transcriptionally regulated expression vector for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 84, 473-479.

Hoffman, C.S., and Winston, F. (1990). Isolation and characterization of mutants constitutive for expression of the *fbp1* gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 124, 807-816.

Hong, S.P., and Carlson, M. (2007). Regulation of *snf1* protein kinase in response to environmental stress. *The Journal of biological chemistry* 282, 16838-16845.

Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.

Hung, G.C., Brown, C.R., Wolfe, A.B., Liu, J., and Chiang, H.L. (2004). Degradation of the gluconeogenic enzymes fructose-1,6-bisphosphatase and malate dehydrogenase is mediated by distinct proteolytic pathways and signaling events. *The Journal of biological chemistry* 279, 49138-49150.

Chan, C.T., Pang, Y.L., Deng, W., Babu, I.R., Dyavaiah, M., Begley, T.J., and Dedon, P.C. (2012). Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nature communications* 3, 937.

Chang, E., Yang, J., Nagavarapu, U., and Herron, G.S. (2002). Aging and survival of cutaneous microvasculature. *The Journal of investigative dermatology* 118, 752-758.

Choder, M. (1991). A general topoisomerase I-dependent transcriptional repression in the stationary phase in yeast. *Genes & development* 5, 2315-2326.

Kaniak, A., Xue, Z., Macool, D., Kim, J.H., and Johnston, M. (2004). Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* 3, 221-231.

Keith, A.D., Pollard, E.C., and Snipes, W. (1977). Inositol-less death in yeast results in a simultaneous increase in intracellular viscosity. *Biophysical journal* 17, 205-212.

Klein, C.J., Olsson, L., and Nielsen, J. (1998). Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions. *Microbiology* 144 (Pt 1), 13-24.

Klosinska, M.M., Crutchfield, C.A., Bradley, P.H., Rabinowitz, J.D., and Broach, J.R. (2011). Yeast cells can access distinct quiescent states. *Genes & development* 25, 336-349.

Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., and van Oers, M.H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415-1420.

Kornberg, A., Rao, N.N., and Ault-Riche, D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual review of biochemistry* 68, 89-125.

Laporte, D., Lebaudy, A., Sahin, A., Pinson, B., Ceschin, J., Daignan-Fornier, B., and Sagot, I. (2011). Metabolic status rather than cell cycle signals control quiescence entry and exit. *The Journal of cell biology* 192, 949-957.

Laporte, D., Salin, B., Daignan-Fornier, B., and Sagot, I. (2008). Reversible cytoplasmic localization of the proteasome in quiescent yeast cells. *The Journal of cell biology* 181, 737-745.

Leao, C., and van Uden, N. (1982). Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering* 24, 2601-2604.

Leao, C., and Van Uden, N. (1983). Effects of ethanol and other alkanols on the ammonium transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering* 25, 2085-2089.

Leao, C., and Van Uden, N. (1984a). Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 774, 43-48.

Leao, C., and van Uden, N. (1984b). Effects of ethanol and other alkanols on the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering* 26, 403-405.

Lewis, D., and Gattie, D. (1991). The ecology of quiescent microbes. *ASM American Society for Microbiology News* 57, 27-32.

Li, L., Miles, S., Melville, Z., Prasad, A., Bradley, G., and Breeden, L.L. (2013). Key events during the transition from rapid growth to quiescence in budding yeast require posttranscriptional regulators. *Molecular biology of the cell* 24, 3697-3709.

Lillie, S.H., and Pringle, J.R. (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *Journal of bacteriology* 143, 1384-1394.

Lipke, P.N., and Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of bacteriology* 180, 3735-3740.

Lo, W.S., Duggan, L., Emre, N.C., Belotserkovskya, R., Lane, W.S., Shiekhhattar, R., and Berger, S.L. (2001). Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* 293, 1142-1146.

Loewith, R., and Hall, M.N. (2011). Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* 189, 1177-1201.

Longo, V.D., Gralla, E.B., and Valentine, J.S. (1996). Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *The Journal of biological chemistry* 271, 12275-12280.

Longo, V.D., Liou, L.L., Valentine, J.S., and Gralla, E.B. (1999). Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Archives of biochemistry and biophysics* 365, 131-142.

Looke, M., Kristjuhan, K., and Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques* 50, 325-328.

Lu, C., Brauer, M.J., and Botstein, D. (2009). Slow growth induces heat-shock resistance in normal and respiratory-deficient yeast. *Molecular biology of the cell* 20, 891-903.

Marsh, L., Neiman, A.M., and Herskowitz, I. (1991). Signal transduction during pheromone response in yeast. *Annual review of cell biology* 7, 699-728.

McConnell, S.J., Stewart, L.C., Talin, A., and Yaffe, M.P. (1990). Temperature-sensitive yeast mutants defective in mitochondrial inheritance. *The Journal of cell biology* 111, 967-976.

Millard, P.J., Roth, B.L., Thi, H.P., Yue, S.T., and Haugland, R.P. (1997). Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Applied and environmental microbiology* 63, 2897-2905.

Murphy, D.J., and Vance, J. (1999). Mechanisms of lipid-body formation. *Trends in biochemical sciences* 24, 109-115.

Murray, P.J. (1999). Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. *Trends in microbiology* 7, 366-372.

O'Neill, E.M., Kaffman, A., Jolly, E.R., and O'Shea, E.K. (1996). Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex. *Science* 271, 209-212.

Ogawa, N., DeRisi, J., and Brown, P.O. (2000). New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Molecular biology of the cell* 11, 4309-4321.

Orlova, M., Kanter, E., Krakovich, D., and Kuchin, S. (2006). Nitrogen availability and TOR regulate the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* 5, 1831-1837.

Painting, K., and Kirsop, B. (1990). A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. *World journal of microbiology & biotechnology* 6, 346-347.

Palková, Z., Devaux, F., Icíková, M., Minariková, L., Le Crom, S., and Jacq, C. (2002). Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Molecular biology of the cell* 13, 3901-3914.

Palková, Z., and Forstová, J. (2000). Yeast colonies synchronise their growth and development. *Journal of cell science* 113 (Pt 11), 1923-1928.

Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospíšek, M., and Forstová, J. (1997). Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390, 532-536.

Palková, Z., and Váchová, L. (2006). Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS microbiology reviews* 30, 806-824.

Palková, Z., Wilkinson, D., and Váchová, L. (2014). Aging and differentiation in yeast populations: elders with different properties and functions. *FEMS yeast research* 14, 96-108.

Pardee, A.B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 1286-1290.

Parrish, N.M., Dick, J.D., and Bishai, W.R. (1998). Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in microbiology* 6, 107-112.

Pinon, R. (1978). Folded chromosomes in non-cycling yeast cells: evidence for a characteristic go form. *Chromosoma* 67, 263-274.

Piper, P. (1998). Differential role of Hsps and trehalose in stress tolerance. *Trends in microbiology* 6, 43-44.

Popolo, L., Vanoni, M., and Alberghina, L. (1982). Control of the yeast cell cycle by protein synthesis. *Experimental cell research* 142, 69-78.

Pringle, J.R. (1991). Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor. *Methods in enzymology* 194, 732-735.

Pringle, J.R., and Hartwell, L.H. (1981). The *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle.

Reggiori, F., and Klionsky, D.J. (2013). Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. *Genetics* 194, 341-361.

Riccardi, C., and Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols* 1, 1458-1461.

Sagot, I., Pinson, B., Salin, B., and Daignan-Fornier, B. (2006). Actin bodies in yeast quiescent cells: an immediately available actin reserve? *Molecular biology of the cell* 17, 4645-4655.

Salgueiro, S.P., Sa-Correia, I., and Novais, J.M. (1988). Ethanol-Induced Leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetics and Relationship to Yeast Ethanol Tolerance and Alcohol Fermentation Productivity. *Applied and environmental microbiology* 54, 903-909.

Sethuraman, A., Rao, N.N., and Kornberg, A. (2001). The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 8542-8547.

Sherman, M.Y., and Goldberg, A.L. (2001). Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. Neuron 29, 15-32.

Shimoi, H., Kitagaki, H., Ohmori, H., Iimura, Y., and Ito, K. (1998). Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. Journal of bacteriology 180, 3381-3387.

Shirra, M.K., Patton-Vogt, J., Ulrich, A., Liuta-Tehlivets, O., Kohlwein, S.D., Henry, S.A., and Arndt, K.M. (2001). Inhibition of acetyl coenzyme A carboxylase activity restores expression of the *INO1* gene in a *snf1* mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and cellular biology 21, 5710-5722.

Sillje, H.H., Paalman, J.W., ter Schure, E.G., Olsthoorn, S.Q., Verkleij, A.J., Boonstra, J., and Verrips, C.T. (1999). Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of bacteriology 181, 396-400.

Smets, B., Ghillebert, R., De Snijder, P., Binda, M., Swinnen, E., De Virgilio, C., and Winderickx, J. (2010). Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. Current genetics 56, 1-32.

Soulard, A., Cremonesi, A., Moes, S., Schutz, F., Jenö, P., and Hall, M.N. (2010). The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. Molecular biology of the cell 21, 3475-3486.

Stowe, D.F., and Camara, A.K. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. Antioxidants & redox signaling 11, 1373-1414.

Stukey, J.E., McDonough, V.M., and Martin, C.E. (1989). Isolation and characterization of *OLE1*, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of biological chemistry 264, 16537-16544.

Stukey, J.E., McDonough, V.M., and Martin, C.E. (1990). The *OLE1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene. The Journal of biological chemistry 265, 20144-20149.

Suda, T., Arai, F., and Hirao, A. (2005). Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends in immunology* 26, 426-433.

Suissa, M., Suda, K., and Schatz, G. (1984). Isolation of the nuclear yeast genes for citrate synthase and fifteen other mitochondrial proteins by a new screening method. *The EMBO journal* 3, 1773-1781.

Surana, U., Robitsch, H., Price, C., Schuster, T., Fitch, I., Futcher, A.B., and Nasmyth, K. (1991). The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* 65, 145-161.

Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *The Journal of cell biology* 119, 301-311.

Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., and Fujimoto, T. (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *The Journal of biological chemistry* 277, 44507-44512.

Thevelein, J.M., and de Winder, J.H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* 33, 904-918.

Thomas, D., and Surdin-Kerjan, Y. (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 61, 503-532.

Timblin, B.K., and Bergman, L.W. (1997). Elevated expression of stress response genes resulting from deletion of the *PHO85* gene. *Molecular microbiology* 26, 981-990.

Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J.D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E.G., and Wigler, M. (1987a). Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 7, 1371-1377.

Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., and Wigler, M. (1987b). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50, 277-287.

Treitel, M.A., Kuchin, S., and Carlson, M. (1998). Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 18, 6273-6280.

Tsukada, M., and Gallwitz, D. (1996). Isolation and characterization of SYS genes from yeast, multicopy suppressors of the functional loss of the transport GTPase Ypt6p. *Journal of cell science* 109 (Pt 10), 2471-2481.

Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., *et al.* (2007). Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell* 26, 663-674.

Váchová, L., Chernyavskiy, O., Strachotová, D., Bianchini, P., Burdiková, Z., Ferciková, I., Kubínová, L., and Palková, Z. (2009a). Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environmental microbiology* 11, 1866-1877.

Váchová, L., Kučerová, H., Devaux, F., Úlehlová, M., and Palková, Z. (2009b). Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environmental microbiology* 11, 494-504.

Váchová, L., and Palková, Z. (2005). Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *The Journal of cell biology* 169, 711-717.

Váchová, L., Šťovíček, V., Hlaváček, O., Chernyavskiy, O., Štěpánek, L., Kubínová, L., and Palková, Z. (2011). Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *The Journal of cell biology* 194, 679-687.

Velot, C., Lebreton, S., Morgunov, I., Usher, K.C., and Srere, P.A. (1999). Metabolic effects of mislocalized mitochondrial and peroxisomal citrate synthases in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 38, 16195-16204.

Wang, Y., Shirogane, T., Liu, D., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2003). Exit from exit: resetting the cell cycle through Amn1 inhibition of G protein signaling. *Cell* 112, 697-709.

Wang, Z., Wilson, W.A., Fujino, M.A., and Roach, P.J. (2001). Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p. *Molecular and cellular biology* 21, 5742-5752.

Wei, W., Nurse, P., and Broek, D. (1993). Yeast cells can enter a quiescent state through G1, S, G2, or M phase of the cell cycle. *Cancer research* 53, 1867-1870.

Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G.C., and Singer, R.A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* 57, 383-401.

Werner-Washburne, M., Braun, E.L., Crawford, M.E., and Peck, V.M. (1996). Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* 19, 1159-1166.

Wilson, W.A., Hawley, S.A., and Hardie, D.G. (1996). Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Current biology : CB* 6, 1426-1434.

Woods, A., Munday, M.R., Scott, J., Yang, X., Carlson, M., and Carling, D. (1994). Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *The Journal of biological chemistry* 269, 19509-19515.

Wullschleger, S., Loewith, R., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2005). Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *The Journal of biological chemistry* 280, 30697-30704.

Yamagata, S. (1981). Low-molecular-weight O-acetylserine sulfhydrylase and serine sulfhydrylase of *Saccharomyces cerevisiae* are the same protein. *Journal of bacteriology* 147, 688-690.

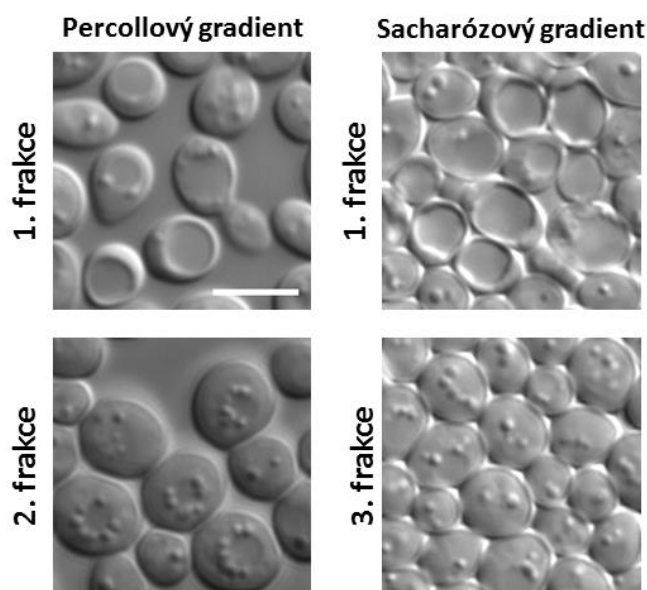
Yamagata, S., Isaji, M., Nakamura, K., Fujisaki, S., Doi, K., Bawden, S., and D'Andrea, R. (1994). Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* *MET17/MET25* gene in *Escherichia coli* and comparative characterization of the product with O-acetylserine.O-acetylhomoserine sulfhydrylase of the yeast. *Applied microbiology and biotechnology* 42, 92-99.

Young, E.T., Dombek, K.M., Tachibana, C., and Ideker, T. (2003). Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *The Journal of biological chemistry* 278, 26146-26158.

9 Přílohy

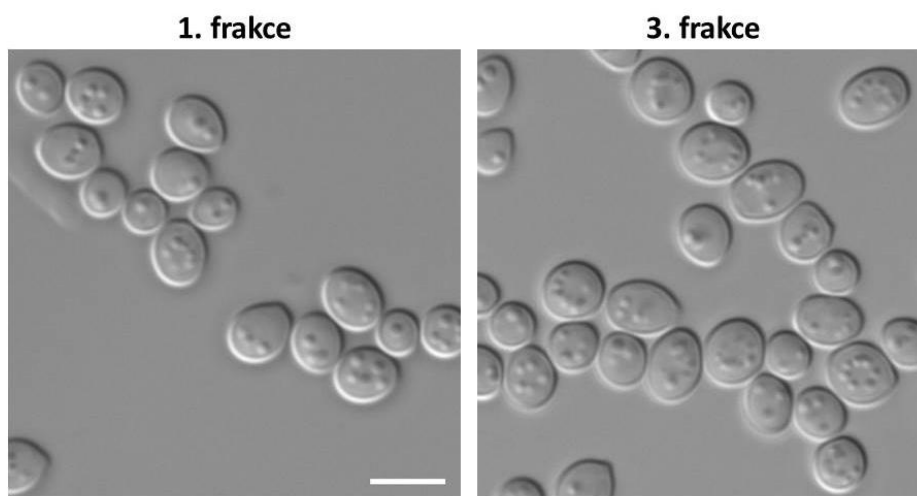
9.1 Dělení kultur kultivovaných v tekutém glukózovém médiu

V rámci práce bylo nutné ověřit, zdali je možno aplikovat metodu dělení na sacharózovém gradientu i v případě kultur kultivovaných v tekutém glukózovém médiu (obrázek 9.1). Při separaci buněk v Percollovém gradientu byl použit postup publikovaný v práci (Allen et al., 2006).

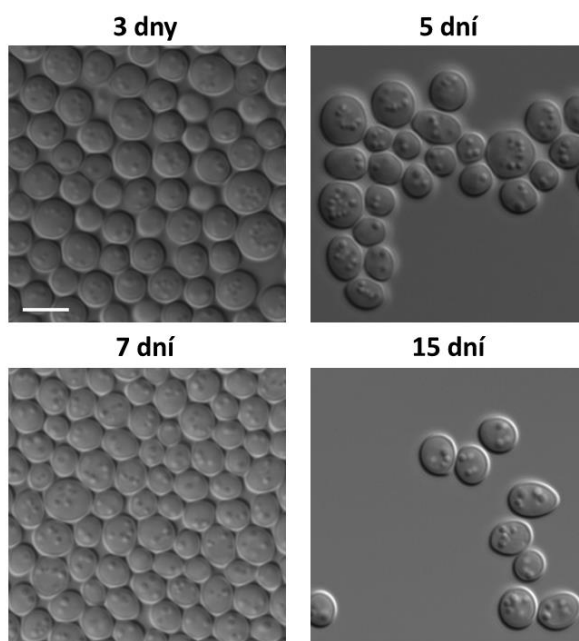


Obrázek 9.1: Dělení 7 dní starých kultur rostoucích v tekutém glukózovém médiu. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μm .

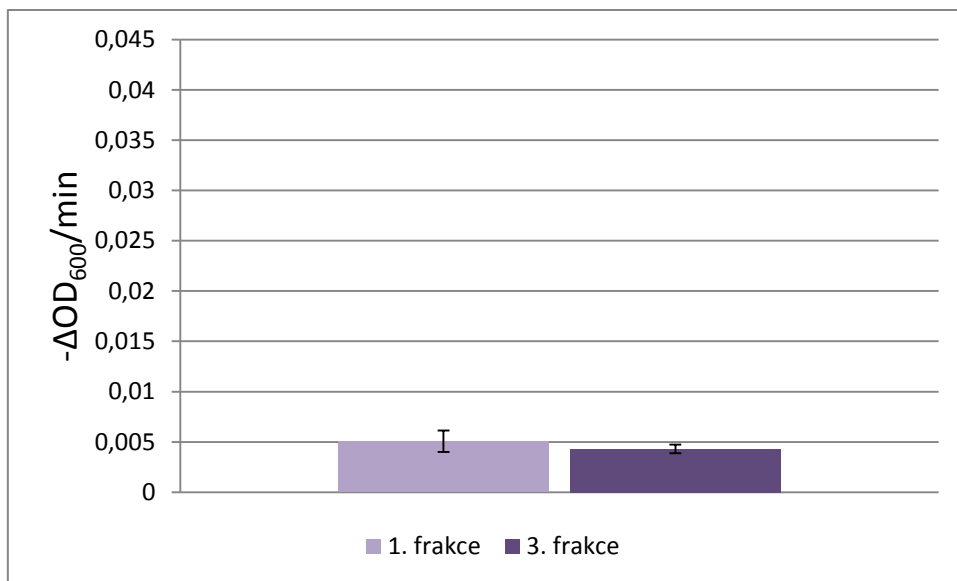
9.2 Kultury kultivované v tekutém glycerolovém médiu



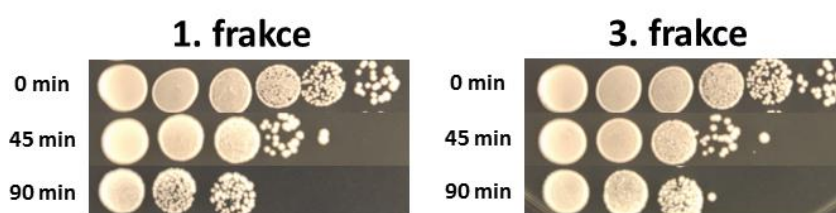
Obrázek 9.2: Dělení 7 dní starých kultur na sacharózovém gradientu. Z obrázku je jasné patrné, že 1. frakci i 3. frakce buněk je tvořena morfologicky shodnými Gly-Q buňkami. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μm .



Obrázek 9.3: Nerozdělené stacionární kultury. Z obrázku je patrné, že během 3-15 dne populaci tvoří pouze Gly-Q buňky. Zobrazené měřítko odpovídá 5 μm .



Graf 9.1: Porovnání citlivosti první a třetí frakce buněk k účinkům zymolázy. Stáří buněk bylo 7 dní. Buňky byly rozděleny na sacharózovém gradientu



Obrázek 9.4: Porovnání teplotní odolnosti první a třetí frakce buněk odebrané ze sacharózového gradientu. Stáří buněk bylo 7 dní.

9.3 Sekvenční analýza zkonstruovaných kmenů

Zde jsou uvedeny výsledky sekvenační analýzy (Sbjct) porovnané s předpokládanou sekvencí (Query). Teoretická sekvence byla získána z databáze *Saccharomyces* Genome Database (SGD) a EUROSCARF. Sekvence byly porovnány v online programu NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Legenda

	shoda sekvence
TTGA	sekvence FWD primeru použitého při výrobě integrační kazety shodná se sekvencí značeného genu
CGCT	sekvence FWD primeru použitého při výrobě integrační kazety shodná se sekvencí plazmidu pYM27
TGCG	fúzní přechod mezi sekvencemi značeného genu a vkládané sekvence

BY4742:ACS1-EGFP

Query	18	TACAAGATATCAAGAAGCATTGTTGCTTTACTGTTAGAAAAGACATCGGGCCATTTGCCG	77
Sbjct	64	TACAAGATATCAAGAAGCATTGTTGCTTTACTGTTAGAAAAGACATCGGGCCATTTGCCG	123
Query	78	CACCAAAATTGATCATTTTAGTGGATGACTTGCCCAAGACAAGATCCGGCAAAATTATGA	137
Sbjct	124	CACCAAAATTGATCATTTTAGTGGATGACTTGCCCAAGACAAGATCCGGCAAAATTATGA	183
Query	138	GACGTATTTTAAGAAAAATCCTAGCAGGAGAAAGTGACCAACTAGGCGACGTTTCTACAT	197
Sbjct	184	GACGTATTTTAAGAAAAATCCTAGCAGGAGAAAGTGACCAACTAGGCGACGTTTCTACAT	243
Query	198	TGTCAAACCCTGGCATTGTTAGACATCTAATTGATTCCGGTCAAGTTGCGTACGCTGCAGG	257
Sbjct	244	TGTCAAACCCTGGCATTGTTAGACATCTAATTGATTCCGGTCAAGTTGCGTACGCTGCAGG	303
Query	258	TCGACGGAGCAGGTGCTGGTGCTGGTGCTGGAGCAATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC	317
Sbjct	304	TCGACGGAGCAGGTGCTGGTGCTGGTGCTGGAGCAATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC	363
Query	318	CCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCG	377
Sbjct	364	CCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCG	423
Query	378	TGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCA	437
Sbjct	424	TGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCA	483
Query	438	CCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGC	497
Sbjct	484	CCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGC	543
Query	498	AGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGC	557
Sbjct	544	AGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGC	603
Query	558	CCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC	617
Sbjct	604	CCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC	663
Query	618	GCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG	677
Sbjct	664	GCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG	723
Query	678	ACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTG	703
Sbjct	724	ACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTG	749

BY4742:CIT1-EGFP

Query	24	TTACGAGTTATTTAAGTTGGTCTCCACCATTTATGAAGTTGCCCCAGGGGTTTTAACTAA	83
Sbjct	70	TTACGAGTTATTTAAGTTGGTCTCCACCATTTATGAAGTTGCCCCAGGGGTTTTAACTAA	129
Query	84	GCATGGTAAAACTAAGAACCCATGGCCAAATGTTGATTACATTCCGGTGTTTTATTGCA	143
Sbjct	130	GCATGGTAAAACTAAGAACCCATGGCCAAATGTTGATTACATTCCGGTGTTTTATTGCA	189
Query	144	ATACTATGGTCTAACTGAGGCTTCGTTCTACACTGTATTGTTTGGTGTTGCCAGAGCTAT	203
Sbjct	190	ATACTATGGTCTAACTGAGGCTTCGTTCTACACTGTATTGTTTGGTGTTGCCAGAGCTAT	249
Query	204	TGGTGTGTTACCCCAATTAATCATCGATAGGGCTGTTGGTGCTCCAATCGAAAGGCCAAA	263
Sbjct	250	TGGTGTGTTACCCCAATTAATCATCGATAGGGCTGTTGGTGCTCCAATCGAAAGGCCAAA	309
Query	264	ATCATCTCTCCACCGAAAAATACAAGGAGTTGGTAAAGAAAAATCGAAAGTAAGAACCGTAC	323
Sbjct	310	ATCATCTCTCCACCGAAAAATACAAGGAGTTGGTAAAGAAAAATCGAAAGTAAGAACCGTAC	369
Query	324	GCTGCAGGTCGACGGAGCAGGTGCTGGTGCTGGTGCTGGAGCAATGAGCAAGGGCGAGGA	383
Sbjct	370	GCTGCAGGTCGACGGAGCAGGTGCTGGTGCTGGTGCTGGAGCAATGAGCAAGGGCGAGGA	429
Query	384	GCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAA	443
Sbjct	430	GCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAA	489
Query	444	GTTACAGCGTGTCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTT	503
Sbjct	490	GTTACAGCGTGTCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTT	549
Query	504	CATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTA	563
Sbjct	550	CATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTA	609
Query	564	CGGCGTGCAAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTC	623
Sbjct	610	CGGCGTGCAAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTC	669
Query	624	CGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA	683
Sbjct	670	CGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA	729
Query	684	CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAA	743
Sbjct	730	CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAA	789
Query	744	GGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGG	779
Sbjct	790	GGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGG	825

BY4742:FBP1-EGFP

Query	17	TGCGACAAGAAGAGCCCCAACGGAAAACTGAGGTTGCTTTATGAGGCCTTCCCAATGGCT	76
Sbjct	451	TGCGACAAGAAGAGCCCCAACGGAAAACTGAGGTTGCTTTATGAGGCCTTCCCAATGGCT	510
Query	77	TTCTTAATGGAACAAGCAGGGGGAAAAGCGGTCAACGATCGCGGAGAGAGAATCTTGGAT	136
Sbjct	511	TTCTTAATGGAACAAGCAGGGGGAAAAGCGGTCAACGATCGCGGAGAGAGAATCTTGGAT	570
Query	137	TTGGTGCCAAGTCATATCCATGACAAATCTTCTATTTGGTTGGGTTCTTCAGGTGAAATT	196
Sbjct	571	TTGGTGCCAAGTCATATCCATGACAAATCTTCTATTTGGTTGGGTTCTTCAGGTGAAATT	630
Query	197	GACAAATTTTTAGACCATATTGGCAAGTCACAGCGTACGCTGCAGGTGCGACGGAGCAGGT	256
Sbjct	631	GACAAATTTTTAGACCATATTGGCAAGTCACAGCGTACGCTGCAGGTGCGACGGAGCAGGT	690
Query	257	GCTGGTGCTGGTGCTGGAGCAATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCC	316
Sbjct	691	GCTGGTGCTGGTGCTGGAGCAATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCC	750
Query	317	ATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCGGCGAGGGC	376
Sbjct	751	ATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCGGCGAGGGC	810
Query	377	GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTG	436
Sbjct	811	GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTG	870
Query	437	CCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTTCAGCCGC	496
Sbjct	871	CCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTTCAGCCGC	930
Query	497	TACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTC	556
Sbjct	931	TACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTC	990
Query	557	CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG	616
Sbjct	991	CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG	1050
Query	617	TTGAGGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGAC	676
Sbjct	1051	TTGAGGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGAC	1110
Query	677	GGCAACATCCTGGG	690
Sbjct	1111	GGCAACATCCTGGG	1124

BY4742:NCE102-EGFP

Query	18	ACAGCTCATACGTTGACAGTAACAAGATTACTCAAGGTTCCGGTACCAGATGTAGACAAG	77
Sbjct	82	ACAGCTCATACGTTGACAGTAACAAGATTACTCAAGGTTCCGGTACCAGATGTAGACAAG	141
Query	78	CTCAAGCCGCTGTTGCATTCTCTACTTCTCTTGTGCCATCTTTTGGCTAAGACCCTGA	137
Sbjct	142	CTCAAGCCGCTGTTGCATTCTCTACTTCTCTTGTGCCATCTTTTGGCTAAGACCCTGA	201
Query	138	TGCTCTGTTTTCAACATGATCTCCAATGGTGCCTTTGGTTCTGGTTCTTTCTCCAAGAGAA	197
Sbjct	202	TGCTCTGTTTTCAACATGATCTCCAATGGTGCCTTTGGTTCTGGTTCTTTCTCCAAGAGAA	261
Query	198	GAAGAACTGGCCAAGTCGGTGTTCCAACCATTTCCTCAAGTC	257
Sbjct	262	GAAGAACTGGCCAAGTCGGTGTTCCAACCATTTCCTCAAGTC	321
Query	258	GAGCAGGTGCTGGTGCTGGTGCTGGAGCAATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGG	317
Sbjct	322	GAGCAGGTGCTGGTGCTGGTGCTGGAGCAATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGG	381
Query	318	TGGTGCCCATCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGCCG	377
Sbjct	382	TGGTGCCCATCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGCCG	441
Query	378	GCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCG	437
Sbjct	442	GCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCG	501
Query	438	GCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCACTGCT	497
Sbjct	502	GCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCACTGCT	561
Query	498	TCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAG	557
Sbjct	562	TCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAG	621
Query	558	GCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG	617
Sbjct	622	GCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG	681
Query	618	AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCA	677
Sbjct	682	AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCA	741
Query	678	AGGAGGACGGCAACATCC	695
Sbjct	742	AGGAGGACGGCAACATCC	759

BY4742:RPL22A-EGFP

Query	16	CCACATCAAGGTCGAAGGTGCTGTCGGTAACTTGGGTAACGCTGTCACTGTCACTGAAGA	75
Sbjct	5	CCACATCAAGGTCGAAGGTGCTGTCGGTAACTTGGGTAACGCTGTCACTGTCACTGAAGA	64
Query	76	TGGTACCGTTGTTACTGTTGTTTCCACTGCCAAGTTCTCTGGTAAGTACTTGAAGTACTT	135
Sbjct	65	TGGTACCGTTGTTACTGTTGTTTCCACTGCCAAGTTCTCTGGTAAGTACTTGAAGTACTT	124
Query	136	GACAAAGAAGTACTTGAAGAAGAACCAATTGAGAGACTGGATCAGATTTGTCTCTACCAA	195
Sbjct	125	GACAAAGAAGTACTTGAAGAAGAACCAATTGAGAGACTGGATCAGATTTGTCTCTACCAA	184
Query	196	GACCAACGAATACAGAT TGGCCTTCTACCAAGTCACTCCAGAAGAAGACGAAGAAGAAGA	255
Sbjct	185	GACCAACGAATACAGAT TGGCCTTCTACCAAGTCACTCCAGAAGAAGACGAAGAAGAAGA	244
Query	256	CGAAGAA CGTACGCTGCAGGTCGAG GGAGCAGGTGCTGGTGCTGGTGCTGGAGCAATGAG	315
Sbjct	245	CGAAGAA CGTACGCTGCAGGTCGAG GGAGCAGGTGCTGGTGCTGGTGCTGGAGCAATGAG	304
Query	316	CAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGT	375
Sbjct	305	CAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGT	364
Query	376	AAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCT	435
Sbjct	365	AAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCT	424
Query	436	GACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCCACCCTCGTGAC	495
Sbjct	425	GACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCCACCCTCGTGAC	484
Query	496	CACCCTGACCTACGGCGTGCACTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGA	555
Sbjct	485	CACCCTGACCTACGGCGTGCACTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGA	544
Query	556	CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA	615
Sbjct	545	CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA	604
Query	616	CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCC	665
Sbjct	605	CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCC	654